

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Tumormimmunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Gedächtnis-T-
Zellen im Kontext der allogenen hämatopoetischen
Stammzelltransplantation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa Isabel Olfe

aus Gifhorn

Datum der Promotion: 02.03.2018

Veröffentlichungen von Teilergebnissen der vorliegenden Arbeit

1. Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht beim Journal of Allergy and Clinical Immunology / Mai 2017

Becker, S.C., Szyska, M., Mensen, A., Hellwig, K., Otto, R., **Olfe, L.**, Vuong, L., Tietze-Bürger, C., Volk, H.D., Dörner, T., Dörken, B., Scheibenbogen, C., Uharek, L., Arnold, R., Schröder, J., Hocke, A.C. and Na, I.-K., *Bone marrow-resident memory cells are equipped with α -defensin*. Eingereicht bei Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017.

2. Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht als Abstrakt zu einer Posterpräsentation auf der Jahrestagung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie) / Oktober 2016:

Olfe, L., Asadi K., Becker S., Mensen A., Szyska M., Tietze-Bürger C., Scheibenbogen C., Schetelig J., Dörken B., Arnold R. and Na I.-K., *Mobilization of tissue-resident memory cells by the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)*. Jahrestagung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie), 2016 (Posterpräsentation).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abstrakt	1
Abstract	3
1 Einleitung.....	4
1.1 Gedächtnis-T-Zellen	4
1.2 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT)	9
1.2.1 Definition und Durchführung.....	9
1.2.2 Komplikationen nach allo-HSZT	10
1.2.3 Immunrekonstitution nach allo-HSZT	12
1.2.4 Stammzellmobilisierung mit G-CSF.....	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Probanden.....	19
2.1.1.1 Stammzellspender.....	19
2.1.1.2 Hüft-TEP-Patienten	19
2.1.1.3 Transplantatempfänger	20
2.1.2 Untersuchungen an den Geweben Tonsillen, Milz und Thymus	20
2.1.3 Geräte	20
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.5 Software	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Isolierung von PBMC und BMMC	23
2.2.2 Kryokonservierung von PBMC und BMMC	23
2.2.3 Phänotypische Charakterisierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	24
2.2.4 Exosomen-Isolation und cDNA Synthese.....	27
2.2.5 Statistische Analyse.....	27
3 Ergebnisse	28
3.1 Charakteristika der Spender und Patienten.....	28
3.1.1 Charakteristika der Stammzellspender	28
3.1.2 Charakteristika der Hüft-TEP-Patienten	28
3.1.3 Charakteristika der Stammzellempfänger	28
3.2 Ergebnisse Stammzellspender	30

3.2.1	T-Zell-Populationen und Subpopulationen	30
3.2.2	Apoptoseneigung der Gedächtnis-T-Zellen	38
3.2.3	Proliferationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen	40
3.2.4	Gewebemarker und <i>Homing</i> -Moleküle auf Gedächtnis-T-Zellen	42
3.2.5	α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen	45
3.2.6	G-CSF-Rezeptor-Expression auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten ...	47
3.3	Ergebnisse Stammzellempfänger	48
3.3.1	Stammzellempfänger – Klinischer Verlauf	48
3.3.2	Stammzellempfänger – Experimentelle Ergebnisse	51
3.3.2.1	T-Zell-Populationen und Subpopulationen	52
3.3.2.2	Apoptoseneigung der Gedächtnis-T-Zellen	59
3.3.2.3	Proliferationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen	60
3.3.2.4	Gewebemarker und <i>Homing</i> -Moleküle auf Gedächtnis-T-Zellen	60
3.3.2.5	α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen	66
3.3.3	CD69 auf Gedächtnis-T-Zellen aus Knochenmark, Tonsillen, Milz und Thymus .	66
4	Diskussion	68
4.1	Methodendiskussion	68
4.2	Ergebnisdiskussion	69
4.2.1	Stammzellspender	70
4.2.1.1	T-Zell-Populationen und Subpopulationen	70
4.2.1.2	Funktionelle Eigenschaften der mobilisierten Gedächtnis-T-Zellen	70
4.2.1.3	Mobilisierung von gewebespezifischen Gedächtnis-T-Zellen	72
4.2.1.4	Das Knochenmark als Quelle für die Mobilisierung von Gedächtnis-T-Zellen..	76
4.2.1.5	Direkte und indirekte Effekte von G-CSF auf Gedächtnis-T-Zellen	79
4.2.2	Stammzellempfänger	80
4.2.2.1	Rekonstitution der T-Zell-Populationen und Subpopulationen nach allo-HSZT	80
4.2.2.2	Funktionelle Eigenschaften der Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSZT	83
4.2.2.3	Verlauf gewebespezifischer Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSZT	83
4.2.2.4	α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSZT	85
4.3	Zusammenfassung der Diskussion	86
5	Ausblick	88
	Literaturverzeichnis	IV
	Eidesstattliche Versicherung	XIV
	Anteilerklärung Publikationen	XV
	Lebenslauf	XVI
	Danksagung	XIX

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
aGvHD	engl. <i>acute Graft-versus-Host Disease</i> (akute Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
Allo-HSZT	Allogene Stammzelltransplantation
AML	Akute myeloische Leukämie
ANC	engl. <i>Absolute Neutrophil Counts</i> (absolute Neutrophilenzahl)
Ann. V	Annexin V
Aqua dest.	destilliertes Wasser
AraC	Cytarabin
BMMC	engl. <i>Bone marrow mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des Knochenmarks)
CCR	Chemokinrezeptoren der Gruppe CC
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
cGvHD	engl. <i>chronic Graft-versus-Host Disease</i> (chronische Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung)
CLA	engl. <i>Cutaneous lymphocyte-associated antigen</i> (Haut-betreffendes Lymphozyten-assoziiertes Antigen)
CMV	Cytomegalievirus
C _t	engl. <i>cycle threshold</i> (Zyklus-Schwellenwert)
CXCL	Chemokinligand der Gruppe CXC
CXCR	Chemokinrezeptoren der Gruppe CXC
DEPC	Diethylcarbonat
DLBCL	engl. <i>Diffuse large B-cell Lymphoma</i> (Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	und andere
FACS	engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Fluoreszenz-basierte Zellsortierung)
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FSC	engl. <i>Forward Side Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Gramm
G-CSF	engl. <i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GvHD	engl. <i>Graft-versus-Host Disease</i> (Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung)
GvL	engl. <i>Graft-versus-Leukemia</i> (Spender-gegen-Leukämie-Reaktion)
GvT	engl. <i>Graft-versus-Tumor</i> (Spender-gegen-Tumor-Reaktion)
Gy	Gray
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HLA-DR	Humanes Leukozytenantigen DR

HNP	engl. <i>Human Neutrophil Peptide</i> (humanes Neutrophilen-Peptid)
HSV	Herpes-simplex-Virus
Hüft-TEP	Totalendoprothese der Hüfte
IMDM	engl. <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> (Zellkulturmedium)
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KM	Knochenmark
m	männlich
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	engl. <i>Mean Fluorescent Intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MiHA	Minor-Histokompatibilitätsantigene
min	Minuten
ml	Milliliter
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MRD	engl. <i>Matched related donor</i> (passend verwandter Spender)
MUD	engl. <i>Matched unrelated donor</i> (passend nicht-verwandter Spender)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PB	Peripheres Blut
PBMC	engl. <i>Peripheral Blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBSZ	Periphere Blutstammzellen
PCR	engl. <i>Polymerase-Chain-Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PI	Propidiumiodid
RIC	engl. <i>Reduced intensity conditioning</i> (intensitätsreduziertes Konditionierungsregime)
RT	Raumtemperatur
S1P	engl. <i>Lipid Sphingosin-1-Phosphat</i> (Signalisierungssphingolipid)
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
sog.	sogenannt
spp.	species pluralis (Spezies)
SSC	engl. <i>Sideward Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
T	Tag
Tab.	Tabelle
TBI	engl. <i>Total body irradiation</i> (Ganzkörperbestrahlung)
T _{CM} / CM	engl. <i>Central Memory Cells</i> (Zentrale Gedächtniszellen)
T _{EM} / EM	engl. <i>Effector Memory Cells</i> (Effektor Gedächtniszellen)
T _{EMRA} / Temra	engl. <i>Terminally differentiated CD45RA⁺ effector memory cells</i> (terminal differenzierte CD45RA ⁺ Effektor Gedächtniszellen)
TEP	Totalendoprothese
T _{naive} / Naive	naive T-Zellen
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
T _{RM}	engl. <i>Resident memory T cells</i>
T _{SCM}	engl. <i>Stem cell memory T cells</i> (Stamm-Gedächtnis T-Zellen)
UpM	Umdrehungen pro Minute
VCAM1	engl. <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (vaskuläres Zelladhäsionsprotein)
VLA-4	engl. <i>very late antigen-4</i> (Integrin $\alpha 4\beta 1$)
vs.	versus
w	weiblich

Abstrakt

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT) stellt eine kurative Behandlungsmöglichkeit bei malignen hämatologischen Erkrankungen dar. Als Nebeneffekt der Konditionierungstherapie sowie aufgrund präventiver Behandlungen zur Unterdrückung der Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (*Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) wird sowohl die Neubildung der Lymphozyten als auch die Entwicklung zu Antigen-erfahrenen Gedächtniszellen gestört. Studien haben gezeigt, dass Gedächtniszellen des Spenders im Transplantat einen unmittelbaren Immunschutz beim Empfänger nach dem Zelltransfer darstellen können. [1-4]

Das periphere Stammzelltransplantat wird, nach Mobilisierung der Spenderstammzellen durch den Wachstumsfaktor G-CSF, gewonnen. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss G-CSF auf die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen beim Spender hat und speziell, ob Gedächtniszellen durch G-CSF aus dem Knochenmark ins Blut mobilisiert werden. Des Weiteren gibt die Arbeit einen Ausblick auf die Rekonstitution der T-Zell- Populationen beim Empfänger nach der Transplantation sowie den klinischen Verlauf dieser Patienten.

Die durchflusszytometrische Analyse der Spenderproben zeigte einen signifikanten Anstieg der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellzahlen im Spenderblut nach G-CSF. Interessanterweise ließ sich zudem eine signifikant geringere Apoptoseneigung der Gedächtniszellen verzeichnen, während keine erhöhte Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 nach G-CSF festgestellt werden konnte. Es zeigte sich nach G-CSF-Behandlung eine leichte Abnahme der CD3⁺ Frequenzen in den Lymphozyten, eine signifikante Verschiebung der CD4/CD8 Ratio in Richtung der CD8⁺ Zellen sowie eine leichte Abnahme der CD45RA⁻ Gedächtniszell-Frequenzen. Die Expression mehrerer *Homing*-Moleküle auf den Blut-Gedächtniszellen inklusive $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CLA, CCR6 und CXCR3 ähnelte nach G-CSF der Expression im Knochenmark. In Zusammenschau der Ergebnisse ergibt sich die Vermutung, dass der Anstieg der Gedächtniszellzahl nicht durch Proliferation, sondern durch eine verminderte Apoptoseneigung sowie die Mobilisierung der Zellen aus Geweben wie dem Knochenmark bedingt ist.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen an den Proben der Stammzellempfänger nach Transplantation bestätigten Ergebnisse anderer Studien: der Anteil der CD4⁺ Zellen zeigte sich zugunsten der CD8⁺ Zellen nach Transplantation gering. Zudem konnte deutlich ein prozentualer Anstieg der T_{EM} Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen sowie ein erhöhter Anteil an T_{EM} und T_{EMRA} Zellen innerhalb der CD8⁺ Population und ein entsprechender Abfall der anderen Subpopulationen im Verlauf nach der Transplantation festgestellt werden. Auf den Gedächtnis-T-Zellen zeigte sich

nach Transplantation ein kontinuierlicher Anstieg von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin. Die gemessene Abnahme der CD69-Expression nach Transplantation könnte auf die Migration der CD69⁺ Gedächtniszellen in das Knochenmark hinweisen.

Die Analyse der klinischen Daten von zehn Patienten zeigte Folgeproblematiken wie Infektionen, GvHD und Rezidive. Ein konkreter Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der T-Zell-Populationen im Spender und dem Auftreten im Empfänger sowie dem klinischen Verlauf lässt sich in der hier untersuchten Kohorte nicht herausarbeiten.

Abstract

Allogenic hematopoietic stem cell transplantation is a potentially curative treatment for hematopoietic malignancies. Conditioning therapy as well as immunosuppressive treatment for prevention or treatment of GvHD impairs the generation of immune cells and maturation to antigen-experienced memory cells. Other studies found that the immune cell composition of the graft influences the immune reconstitution in the recipient and that memory cells of the donor can provide an immediate protection for the recipient after transplantation. [1-4]

Peripheral blood stem cells are collected through apheresis after G-CSF-mobilization. This paper engaged with the influence of G-CSF on the distribution of T cell subsets, the question whether memory T cells from the bone marrow are mobilized into peripheral blood and the immune reconstitution of memory T cells in the recipient after transplantation.

Comparative cytometric analysis of donor blood samples before and after treatment with G-CSF showed a two- to three-fold increase of the CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells upon G-CSF. Memory T cells showed a significantly lower apoptosis-rate after G-CSF with no differences in the expression of the proliferation marker Ki67. The CD3⁺ frequencies decreased within lymphocytes with a lower CD4⁺/CD8⁺ ratio and a reduction in CD45RA⁻ frequencies. The expression of different homing molecules including $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, CLA, CCR6 und CXCR3 on memory T cells after G-CSF treatment seems to resemble the expression in bone marrow. It can be concluded that the increase in memory cell counts is not due to proliferation but to the decreased apoptosis rate and the mobilization from tissues like the bone marrow.

Follow up of recipients of allogenic peripheral stem cell grafts via blood analysis confirmed data from the literature. The CD4⁺/CD8⁺ ratio was low after transplantation. Within the population of CD4⁺ cells, the T_{EM} subset increased steadily while all other subsets declined. An increase in the frequency of T_{EM} and T_{EMRA} cells among CD8⁺ memory T cells was found. The frequency of $\alpha 4\beta 7$ integrin-expressing memory T cells showed an increase whereas the frequency of CD69-expressing memory T cells decreased, which could be due to the migration of the CD69⁺ memory T cells into the bone marrow after transplantation.

Analyzing clinical data from 10 patients after transplantation showed complications as infections, GvHD and relapse. A concrete link between the expression of the homing markers in the graft and the reconstitution in the recipient could not be established in our small cohort.

1 Einleitung

1.1 Gedächtnis-T-Zellen

Die T-Zell vermittelte Immunität stellt ein zentrales Element des adaptiven Immunsystems dar. T-Zellen zirkulieren im Körper um bakterielle, virale und parasitäre Infektionserreger, sowie entartete körpereigene Zellen zu eliminieren. Dabei stellen sie einen integralen Bestandteil einer komplex koordinierten Immunantwort, bestehend aus B-Zellen, Makrophagen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), Mastzellen sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten dar. Die Entwicklung der T-Zellen erfolgt im Thymus. Reife T-Zellen, die noch keinen Antigen-Kontakt erfahren haben, werden als naive Zellen bezeichnet. Diese Zellen verweilen im Blut und in sekundären lymphatischen Organen, wo ihnen durch antigen-präsentierende Zellen Peptide prozessierter Pathogene oder Eigenantigene präsentiert und sie dadurch aktiviert werden. Es kommt zur Proliferation in Form von klonaler Expansion und Migration in die betroffenen Gewebe, wo von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen eine direkte Lyse mittels zellvermittelter Zytotoxizität erfolgt und CD4⁺ T-Helfer-Zellen über die Produktion von Zytokinen wirken. Nach erfolgter Immunantwort verbleibt ein Teil der Zellen als Gedächtnis-T-Zellen. [5]

Gedächtnis-T-Zellen haben die Fähigkeit, bei erneutem Antigenkontakt schneller und stabiler auf das Antigen zu reagieren als naive Zellen und damit eine bessere Abwehr zu ermöglichen [6]. Definiert werden Gedächtniszellen über die Expression des Oberflächenantigens CD45RO bzw. über das Fehlen von CD45RA [7]. Sallusto *et al.* beschreiben zudem zwei unterschiedliche Arten von Gedächtnis-T-Zellen, die während der Immunantwort gebildet werden, Effektor-Gedächtniszellen (engl. *Effector Memory T-Cells*, T_{EM}) und Zentrale-Gedächtniszellen (engl. *Central Memory T-Cells*, T_{CM}) [7]. Auf Effektor-Gedächtniszellen ist die Expression von gewebespezifischen *Homing*-Molekülen hochreguliert. Sie zeigen Effektorfunktionen, sind vor allem im peripheren Blut in der frühen Phase der Immunantwort vorzufinden und migrieren nach dem Höhepunkt der Immunantwort in die peripheren Gewebe, wo sie Pathogene eliminieren können [8-10]. Zentrale-Gedächtniszellen exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7, welcher für die Migration in Lymphknoten verantwortlich ist. Zentrale-Gedächtniszellen besitzen weniger Effektorfunktionen, können jedoch bei erneutem Antigenkontakt schnell proliferieren und sich zu Effektorzellen entwickeln [6, 11]. CD45RA⁺ Zellen werden in naive Zellen, die CCR7 exprimieren und T_{EMRA} (engl. *Terminally Differentiated CD45RA⁺*) Zellen, denen CCR7 fehlt, unterteilt [7]. CD45RA⁺ T_{EMRA} Zellen sind die am stärksten differenzierte Population innerhalb der Gedächtniszellen. Sie haben eine hohe Apoptoseneigung und exprimieren zytotoxische Moleküle

wie Perforin und Fas Ligand. [12] Abbildung 1 zeigt eine Übersicht über die T-Zell-Subpopulationen, definiert über die Expression der Oberflächenmerkmale CCR7 und CD45RA.

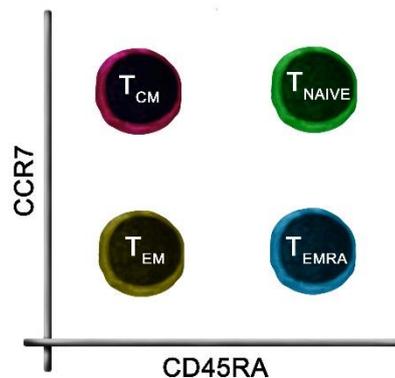


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die Aufteilung erfolgt anhand der Expression der Oberflächenmerkmale CCR7 und CD45RA.

T-Gedächtnis-Stammzellen

Neben den vier Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kann über zusätzliche Marker wie u.a. CD95 eine weitere Population innerhalb der naiven Zellen abgegrenzt werden, die als T-Gedächtnis-Stammzellen (engl. *Stem memory T cells*, T_{SCM}) bezeichnet wird. Es wird diskutiert, ob diesen Zellen stammzellähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden können. Einige Studien zeigen, dass diese Zellen eine erhöhte Proliferation, selbsterneuerndes Potential und Eigenschaften multipotenter Zellen besitzen [13]. Zudem ist beschrieben, dass sie im Transplantationsmodell ein längeres Überleben und ein besseres Anwachsen aufweisen [13-15].

Gewebespezifische Gedächtnis-T-Zellen

Die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion des Immunsystems ist abhängig von der intakten Migration der Zellen in für Zell-Zell-Interaktionen spezialisierte Orte [16, 17]. Als *Homing* bezeichnet man die Migration von zirkulierenden Lymphozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe, die über Oberflächenmoleküle, sogenannte *Homing*-Rezeptoren, erkannt werden. Diese Migration durch Blutgefäßwände vollzieht sich über ein initiales "rolling" (Rollen) bzw. eine primäre Adhäsion, Aktivierung, sekundäre Adhäsion und letztendlich die Diapedese [17]. Chemokin-Rezeptoren sind *Homing*-Moleküle, die sich dadurch auszeichnen, dass sie die Zellen, auf denen sie exprimiert sind, durch einen Chemokin-Gradienten in bestimmte Gewebe führen [18]. Die entsprechenden Liganden sind in den spezifischen Zielgeweben erhöht exprimiert. So ist CCR7 ein Homing-Molekül spezifisch für die in Lymphknoten exprimierten CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 und damit auf Zentralen-T-Gedächtniszellen in den Lymphknoten zu finden. Dahingegen migrieren CCR7⁻ Effektor-T-Gedächtniszellen in die peripheren Gewebe [6]. CCR10 dirigiert als weiteres *Homing*-Moleküle Gedächtniszellen in die Haut [19]. Gedächtniszellen in der

Lunge zeigen eine erhöhte Expression von CCR6 [20]. Auch andere Oberflächenmoleküle wie Glykoproteine oder Integrine sind am *Homing* der Lymphozyten beteiligt. Gedächtniszellen, die in die Haut migrieren, sind durch eine vermehrte Expression von CLA charakterisiert [21], während die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin zu einer Migration in den Darm führt [22].

Gewebeständige Gedächtnis-T-Zellen

Neben Untersuchungen zu den zirkulierenden Gedächtniszellen sind in den letzten Jahren Beschreibungen zu gewebeständigen Gedächtniszellen erschienen. Es wurde gezeigt, dass Gedächtnis-T-Zellen nicht nur im Blut zirkulieren, sondern auch in vielen Geweben wie Haut, Lunge, Darm und Thymus zu finden sind und dort persistieren [23-25]. So ist die Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen in den Geweben deutlich höher als im peripheren Blut. Die geschätzte absolute Zahl an Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut beträgt 5×10^9 bis 10×10^9 . Die im Gewebe ansässigen T-Zellen werden auf 2×10^{10} Zellen in der Haut [21, 26], 1×10^{10} in der Lunge [20], 3×10^{10} im Darm und 20×10^{10} in den lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten und Knochenmark) [27] geschätzt [13]. Gedächtnis-T-Zellen sind die größte T-Zellpopulation in Schleimhaut, Haut, Milz und Knochenmark [28]. Gewebeständige Gedächtnis-T-Zellen (engl. *Tissue-resident memory T cells*, T_{RM}) sind dadurch charakterisiert, dass sie im Gewebe persistieren und nicht im peripheren Blut zirkulieren und gewebespezifische Eigenschaften aufweisen. Es wird vermutet, dass diese an dem Ort, an dem sie ansässig sind, eine wichtige Rolle beim Schutz gegen latente Virus-Infektionen und eine erste Antwort gegen bekannte Antigene darstellen und aufgrund ihrer Lokalisation besonders schnell reagieren können [29].

Neben den oben beschriebenen *Homing*-Molekülen, sind $CD4^+$ und $CD8^+$ T_{RM} durch eine hohe Expression des Markers CD69 charakterisiert [30]. $CD8^+$ T_{RM} Zellen exprimieren den Marker CD103 ($\alpha E\beta 7$ Integrin). $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, die CD69 und CD103 exprimieren, sind als die dominierenden T-Zell-Subpopulationen in den Geweben Lunge, Darm, Haut und Knochenmark beschrieben [13, 24, 28, 30]. Lymphoide Gewebe enthalten ebenfalls Zentrale- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, die zum Teil CD69, jedoch nicht CD103 exprimieren [13, 30]. Abbildung 2 gibt einen Überblick über das Migrationsverhalten der T-Zell-Populationen.

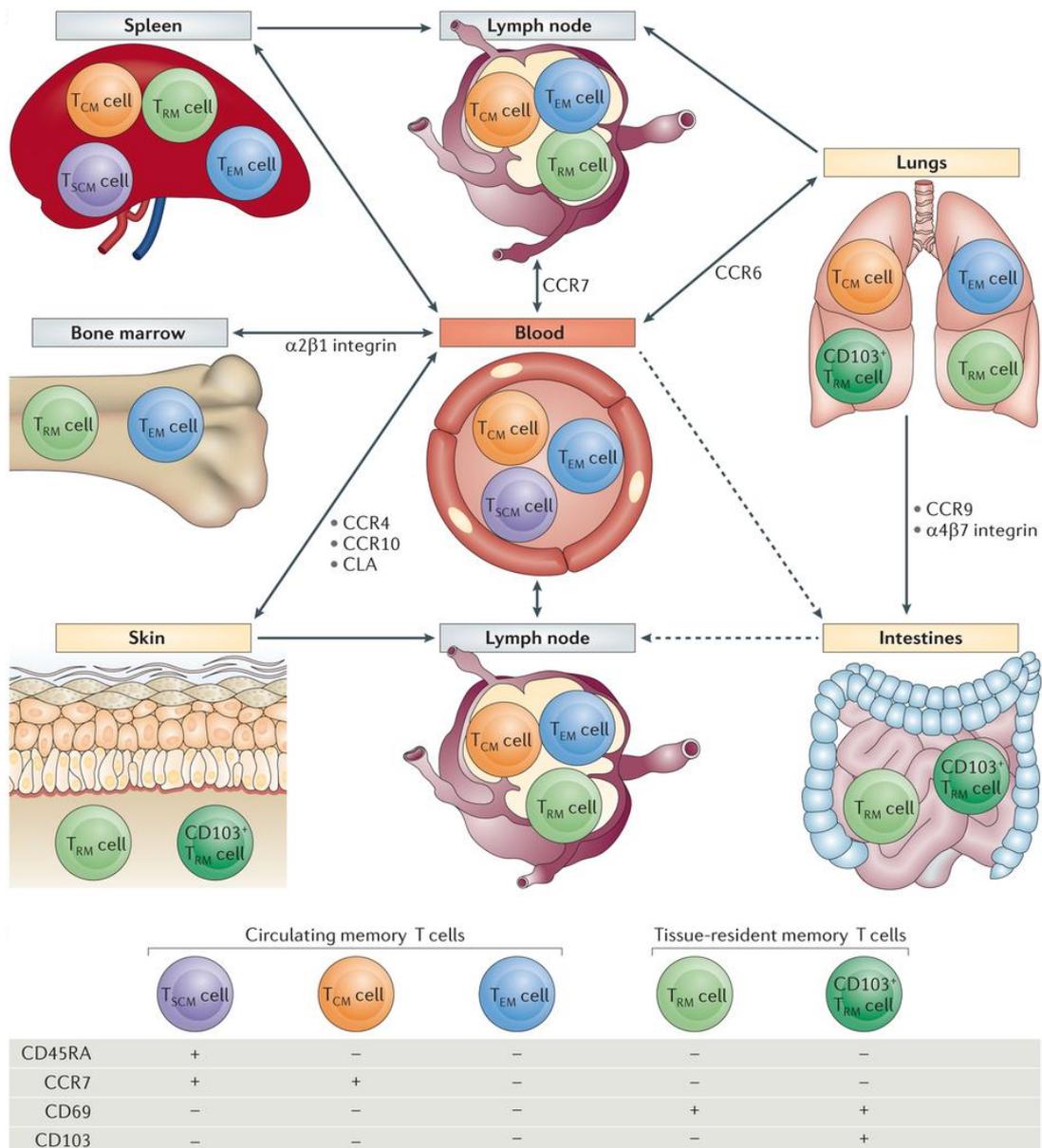


Abbildung 2: Migration Gewebeverteilung und Migrationsverhalten der wichtigsten T-Zell-Populationen nach Farber et. al. [13]. Dargestellt sind die Kompartimente Haut (Skin), Lunge (lungs), Lymphknoten (lymph node), Darm (intestines), Knochenmark (bone marrow), Milz (spleen) und Blut (blood). Die Subpopulationen T_{SCM} (T-Gedächtnis-Stammzellen), T_{CM} (Zentrale Gedächtniszellen), T_{EM} (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen) und T_{RM} (gewebeständige Gedächtnis-T-Zellen) sowie die sie charakterisierenden Markerexpressionen sind gezeigt. Die Pfeile beschreiben das Migrationsverhalten, die entsprechenden Homing-Moleküle sind dargestellt.

Das Knochenmark als Nische für Gedächtnis-T-Zellen

Gedächtnis-T-Zellen sind in verschiedenen Kompartimenten im gesamten Körper zu finden. In besonders hoher Anzahl befinden sie sich an den Stellen, an denen Pathogene eintreten, sowie im Knochenmark. Während die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Gedächtniszellen bei fehlendem Stimulus mit der Zeit abnimmt, können die Gedächtniszellen im Knochenmark verweilen. Das Knochenmark stellt somit nicht nur die Quelle von T-Zell-Vorläufern dar, sondern

beinhaltet zudem eine größere Anzahl an T-Zellen, die spezifisch für systemische Antigene sind, als das periphere Blut. [31]

Letsch *et al.* haben gezeigt, dass CMV-spezifische CCR7⁺ CD45RA⁻ T_{CM} ausschließlich im Knochenmark und nicht im peripheren Blut vorkommen. Zudem konnten CMV-spezifische T-Zellen des Knochenmarks effizienter expandiert werden als die des peripheren Blutes. [32] Palendira *et al.* haben gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch für lytische Antigene von EBV sind, im Knochenmark dreifach erhöht sind gegenüber denen im peripheren Blut [33] und Guerreiro *et al.* zeigten, dass TNF-produzierende EBV-spezifische T-Gedächtniszellen im Knochenmark deutlich stärker vertreten sind als im peripheren Blut [34]. Racanelli *et al.* wiesen nach, dass Hepatitis C-Virus-spezifische T-Zellen im Knochenmark bei persistierender Hepatitis C-Infektion nachweisbar sind. Diese wiesen im Vergleich zu HCV-spezifischen Zellen in der Leber und im peripheren Blut bessere antivirale Effektorfunktionen auf. [35] Zudem wurde gezeigt, dass Tetanus-spezifische CD4⁺ T-Zellen im Knochenmark von gegen diesen Erreger geimpften Personen zu finden sind [3, 31].

Di Rosa und Pabst beschreiben, dass eine extensive Migration der reifen T-Zellen vom Blut ins Knochenmark und *vice versa* stattfindet und das Knochenmark ein bevorzugtes Zielorgan für die Migration von Gedächtnis-T-Zellen darstellt [36]. Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen innerhalb von drei bis acht Wochen nach ihrer Entstehung in das Knochenmark wandern und dort in ruhender Form verweilen. Nach Restimulation werden sie schnell aktiviert, produzieren Zytokine und regen B-Zellen zur Produktion hoch spezifischer Antikörper an [37]. CD8⁺ T-Zellen proliferieren stärker im Knochenmark als in den übrigen Organen [38, 39]. Das Knochenmark trägt zudem zu einem Großteil zum langfristigen zytotoxischen T-Zell-Gedächtnis bei [36]. Bei *in vitro* Stimulation der knochenmarkständigen CD8⁺ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen regulieren diese Perforin, Granzym B und FasL hoch und zeigen gegenüber blutstämmigen Gedächtniszellen eine erhöhte Zytotoxizität [40]. Knochenmarks-T-Zellen zeigen potente antigen-spezifische Effektorfunktion in Mausstudien [41] und in *in vitro* Studien [42].

In einigen Studien werden die Knochenmark-T-Zellen als gewebeständige T_{RM} Zellen beschrieben [31]. Dies beinhaltet, dass die Gedächtniszellen im Knochenmark persistieren. Im Gegensatz dazu führen Di Rosa und Gebhardt an, dass unter Gleichgewichtsbedingungen die im Knochenmark befindlichen T-Zellen im Gegensatz zu anderen Geweben hauptsächlich zirkulatorisch sind. Unterschiede könnten darin bestehen, wie lange die Zellen im Knochenmark verweilen. [43]

In der Zusammenschau zeigen diese Ergebnisse aus der Literatur, dass das Knochenmark eine wichtige Nische für potente Gedächtniszellen und damit für die langfristige Aufrechterhaltung des immunologischen Gedächtnisses darstellt. Die Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass Gedächtnis-T-Zellen, die aus dem Knochenmark stammen, Gedächtnis-T-Zellen aus dem peripheren Blut hinsichtlich Zytotoxizität und Antigenpezifität überlegen sind.

1.2 Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT)

1.2.1 Definition und Durchführung

Die hämatopoetische Stammzelltransplantation stellt eine kurative Behandlungsmöglichkeit bei malignen hämatologischen Erkrankungen dar. Eine Transplantation hämatopoetischer Stammzellen hat das Ziel das Blutsystem nach einer Chemotherapie oder Strahlentherapie zu regenerieren. Unterschieden wird in die autologe Stammzelltransplantation, bei der patienteneigene Stammzellen transplantiert werden und die allogene Stammzelltransplantation (allo-HSZT), bei der Zellen eines verwandten oder nicht-verwandten, gesunden Spenders übertragen werden. Die Spenderauswahl erfolgt basierend auf der Übereinstimmung der humanen Leukozyten Antigen-Merkmale (HLA-Merkmale). Dabei gibt es die Möglichkeit eines HLA-identischen Familien- (engl. *matched related donor*, MRD) oder Fremdspender (engl. *matched unrelated donor*, MUD), sowie die Möglichkeit trotz Unterschieden in den HLA-Merkmalen (engl. *HLA-Mismatch*) zu transplantieren. [44]

Hämatopoetische Stammzellen können aus Knochenmark, aus Nabelschnurblut oder aus peripherem Blut gewonnen werden. Um Stammzellen aus peripherem Blut zu gewinnen, muss zunächst eine Mobilisierungstherapie, z.B. mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) durchgeführt werden. G-CSF mobilisiert Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Durch eine Leukapherese werden die peripheren Blutstammzellen zusammen mit anderen peripheren Immunzellen gewonnen und das Apheresat dem Patienten übertragen.[45] Die im Transplantat erhaltenen T-Zellen führen einerseits zu einem erwünschten Graft-versus-Tumor (GvT) bzw. Graft-versus-Leukemia-Effekt (GvL), bei dem sich die T-Zellen des Spenders gegen die im Empfänger verbliebenen malignen Tumor- bzw. Leukämie-Zellen richten [46]. Andererseits können sie die ungewollte Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (engl. *Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) auslösen [47]. Um das Risiko einer GvHD zu vermeiden, besteht die Möglichkeit T-Zellen und anderen Lymphozyten durch eine Lymphodepletion vor der Transplantation aus dem Apheresat zu entfernen. Dies reduziert jedoch auch den gewünschten GvT-Effekt. [47]

Vor der Transplantation des Apheresats erhält der Stammzellempfänger eine Konditionierungstherapie. Die Konditionierung beinhaltet die Myeloablation (Entfernung des Markraums), die Immunsuppression (zur Vermeidung der Transplantatabstoßung) und die Eradikation (Entfernung der malignen Zellen). Je nach Intensität wird zwischen den myeloablativen, den nicht-myeloablativen und den intensitätsreduzierten Konditionierungsregimen unterschieden. Durch die intensitätsreduzierten Konditionierungsregime besteht die Möglichkeit auch ältere Patienten und Patienten mit Komorbiditäten zu konditionieren und zu transplantieren. [44]

1.2.2 Komplikationen nach allo-HSZT

Neben der Gefahr, dass es nach der Stammzelltransplantation zu einer Progression der malignen Grunderkrankung bzw. zu einem Rezidiv kommt, stellen GvHD und Infekte wichtige Komplikationen dar.

Graft-versus-Host Disease

Bei der Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung erkennen die im Transplantat des Spenders enthaltenden T-Zellen, die Histokompatibilitätsantigene des Empfängers als fremd und reagieren gegen die Zellen und Gewebe, die diese exprimieren [47]. Unterschieden wird in die akute und die chronische Form. Die akute GvHD (aGvHD) tritt meist innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation auf und ist durch Hautausschläge, Leberentzündung und Durchfälle gekennzeichnet [44]. Das Risiko einer moderaten bis schweren aGvHD beträgt 40%, kann jedoch in Abhängigkeit von den Risikofaktoren stark schwanken [48]. Die aGvHD wird in vier Grade eingeteilt. Die chronische GvHD (cGvHD) tritt meist nach dem 100. Tag auf. Das Risiko beträgt 40% bei HLA-identen Familienspenden und bis zu 70 % bei HLA-identen Fremdspenden [48]. Typische Symptome sind das Sicca-Syndrom sowie lichenoiden und sklerodermatöse Hautveränderungen. Bei der cGvHD erfolgt die Einteilung in limitierte und extensive GvHD. Die Abgrenzung aufgrund des zeitlichen Auftretens vor bzw. nach 100 Tagen wird mittlerweile verlassen und die klinische Symptomatik als ausschlaggebend für die Einteilung in akute und chronische GvHD angesehen. [44]

Prophylaxe und Therapie der Graft-versus-Host Disease

Zur Prophylaxe der GvHD wird häufig Methotrexat und ein Calcineurininhibitor eingesetzt. Zudem gibt es die Möglichkeit den polyklonalen Antikörper Antithymozytenglobulin (ATG) oder monoklonale Antikörper wie Alemtuzumab (anti-CD52) einzusetzen. Die Standardbehandlung der GvHD erfolgt mit Kortikosteroiden, die Behandlungsmöglichkeiten bei der steroidrefraktären GvHD sind limitiert und Gegenstand aktueller Forschung. [44, 48]

Infektionen

Durch den Einsatz von zytoreduktiven Konditionierungsregimes werden neben den malignen Zellen auch die gesunden Immunzellen reduziert. Dies ist zum einen gewollt, da die Abstoßung der Spenderzellen durch die Immunzellen des Empfängers verhindert wird und somit das erfolgreiche Anwachsen der hämatopoetischen Stammzellen in der Knochenmarksnische ermöglicht wird. Zum anderen führt dies zu einer verzögerten Immunrekonstitution, die eine erhöhte Mortalität und Morbidität, bedingt durch Infektionen und Rezidive der Grunderkrankung, zur Folge haben kann. [49, 50]

Während Infekte im ersten Monat nach Transplantation vor allem auf die fehlenden Granulozyten und Monozyten zurückzuführen sind, lassen sich später auftretende Infektionen vor allem durch den Mangel an CD4⁺ T-Helferzellen und B-Zellen erklären [51]. Es werden drei Phasen nach Stammzelltransplantation unterschieden, in denen bestimmte Infektionen gehäuft auftreten [52]. Die erste Phase umfasst die ersten 30 Tage nach Transplantation, in der Neutropenie und Mukositis dominieren. In dieser Zeit treten Infektionen durch gram-positive Bakterien, oft durch Katheterinfektionen, und gram-negative Bakterien, durch die endogene Darmflora, auf. Zudem sind fungale Infektionen durch *Candida* spp. (species pluralis) und virale Infektionen z.B. durch Herpes-simplex-Virus (HSV) häufig. Infektionen äußern sich in dieser Phase als Sepsis, Pneumonie, Oropharyngitis, Sinusitis, Proktitis oder Zellulitis. [52]

Die zweite Phase umfasst den Zeitraum zwischen Tag 30 und Tag 100 nach Transplantation. Dominierend sind in dieser Phase virale Infektionen wie Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV), Adenovirus, BK-Polyomavirus, respiratorische Viren und Pilzinfektionen wie *Pneumocystis jiroveci*, *Candida* spp. und *Aspergillus* spp. [52].

Die dritte Phase beschreibt den Zeitraum ab Tag 100 nach Transplantation. Infektionen in dieser Zeit werden beeinflusst vom Auftreten einer cGvHD, die die Rekonstitution der Immunität behindert. Zudem kann es durch cGvHD und Bestrahlung zu einer funktionellen Asplenie und damit einem gehäuften Auftreten von umkapselten Bakterien kommen. [52, 53]

Die beschriebene und in Abbildung 3 gezeigte Chronologie bezieht sich auf Patienten, die myeloablativ konditioniert wurden. Bei einer intensitätsreduzierten Konditionierung sind Infektionen aufgrund von Neutropenie und Mukositis, wie sie in der ersten Phase nach Transplantation auftreten, weniger häufig. Fungale und virale Infektionen während der zweiten und letzten Phase sind vergleichbar, da diese von dem Auftreten einer GvHD beeinflusst werden und diese mit ähnlicher Inzidenz auftritt. [52, 53]

Phase	I: vor Anwachsen (Tag 0 bis +30)	II: nach Anwachsen (Tag +30 bis +100)	III: späte Phase (ab Tag +100)
Risikofaktoren	Neutropenie reduzierte T-Zellen /B-Zellen funktionelle Asplenie	reduzierte T-Zellen /B-Zellen funktionelle Asplenie Auftreten/Behandlung akute GvHD	reduzierte T-Zellen /B-Zellen funktionelle Asplenie Auftreten/Behandlung chronische GvHD
Bakterien	gram-negative Bakterien gram-positive Bakterien		bekapselte Bakterien
Pilze	Aspergillus spp		
	Candida spp		
		Pneumocystis jirovecii	
Viren	Herpes simplex virus		
		Zytomegalievirus	
		Varizella-Zoster-Virus	
		Epstein Barr PTLD	
	HHV-6, respiratorische und enterische Viren		

Abbildung 3: Infektionen nach Stammzelltransplantation. PTLD: Posttransplant lymphoproliferative Erkrankung; HHV-6: humanes Herpesvirus 6. Adaptiert durch Apperley et al. [54] und nach Tomblin et al. [53]

Prophylaxe und Therapie von Infektionen

Zur Prophylaxe von Infektionen durch Herpesviren wird regelmäßig Aciclovir verabreicht, zur Prophylaxe von Pilzinfektionen wird häufig Fluconazol systemisch gegeben [44]. Die Prophylaxe bakterieller und viraler Infektionen kann zudem durch Impfungen erfolgen. Es ist nicht immer möglich das geschädigte immunologische Gedächtnis durch Impfungen wiederherzustellen. Damit Impfungen eine klinisch relevante Wirkung erreichen können, muss das Immunsystem zu einem gewissen Grad wiederhergestellt sein. Um eine immunologische Antwort auf neue Antigene zu erzielen, bedarf es neben B-Zellen auch naiver T-Zellen. Diese, insbesondere die CD4⁺ T-Helfer Zellen, sind in den ersten drei Monaten nach der Transplantation sehr niedrig und regenerieren in der Regel erst nach 6-12 Monate. [55]

1.2.3 Immunrestitution nach allo-HSZT

Voraussetzung für das Langzeitüberleben nach erfolgter Transplantation ist neben dem Anwachsen der Stammzellen im Knochenmark die effiziente Immunzellneubildung im Thymus und Knochenmark des Empfängers. Durch die fast vollständige Lymphodepletion sowohl im

Rahmen des myeloablativen, als auch des nicht-myeloablativen Konditionierungsregimes, müssen die Lymphozytenpopulationen nach der Transplantation aus den im Transplantat enthaltenen reifen Lymphozyten und ihren Vorläufern aufgebaut werden. [53] Die Immunrekonstitution nach Stammzelltransplantation hängt von vielen Faktoren ab. So spielen Charakteristika des Transplantatempfängers wie Alter, Geschlecht und die zugrundeliegende maligne Entität eine Rolle. Außerdem haben die Art der Transplantation, die Stammzellquelle, die HLA-Kompatibilität, das Konditionierungsregime, die GvHD-Prophylaxe, das Auftreten und der Schweregrad sowie die Behandlung einer möglichen GvHD einen Einfluss auf die Immunrekonstitution. [51]

Die Wiederherstellung der Immunität wird durch die Quantität der Immunzelltypen wie Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) und Lymphozyten und ihrer jeweiligen funktionellen Subpopulationen bestimmt. [51] Die einzelnen Immunzellpopulationen zeigen unterschiedliche Verläufe der Regeneration nach Transplantation (Abbildung 2). Das Anwachsen der Monozyten findet als erstes statt und ist gefolgt von dem der Granulozyten, Thrombozyten und NK-Zellen [56]. Laut der *European Society for Blood and Marrow Transplantation* ist das Anwachsen der neutrophilen Granulozyten definiert als der Wiederanstieg der absoluten Zahl an Neutrophilen (absolute neutrophil counts, ANC) auf $> 0,5 \times 10^9$ Zellen/Liter an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Das Anwachsen der neutrophilen Granulozyten hängt von der Stammzellquelle ab. So ist bei PBSZ (peripheren Blut-Stammzellen) bereits nach zwei Wochen, bei Knochenmarkstammzellen nach ca. drei Wochen ein Anwachsen zu verzeichnen [57].

Bei der Rekonstitution der T-Zellen wird in $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen und $CD4^+$ T-Helferzellen unterschieden. Während die Anzahl der $CD8^+$ T-Zellen häufig schnell zunimmt, ist die Regeneration der $CD4^+$ Zellen, insbesondere bei Behandlung des Patienten mit ATG, stark verlangsamt [58]. Gedächtnis-T-Zellen expandieren als erstes nach Transplantation und sind entweder Spender-Gedächtniszellen, die mit dem Transplantat übertragen wurden, oder Gedächtniszellen des Empfängers, welche das Konditionierungsregime überlebt haben [51, 59]. Die im Apheresat enthaltenen Gedächtnis-T-Zellen des Spenders expandieren Thymus-unabhängig im Patienten. Dies ist zum einen durch Reaktivität gegenüber Herpesviren wie CMV und EBV und zum anderen durch die Alloreaktivität vor allem der $CD8^+$ T Zellen bedingt. [51] Durch die homöostatische Expansion kommt es zu einer Einschränkung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires und damit zu einer Beeinträchtigung der adaptiven Immunität [60, 61]. Die homöostatische Expansion vollzieht sich vor allem bei den $CD8^+$ T-Zellen und weniger bei den

CD4⁺ Zellen, sodass eine reduzierte CD4/CD8 Ratio nach Transplantation vorherrscht [62]. Des Weiteren kommt es zu einer Thymus-abhängigen Rekonstitution, die insbesondere für die Rekonstitution der CD4⁺ Zellen entscheidend ist. Naive T-Zellen entstehen im Thymus aus Vorläuferzellen, die aufgrund der negativen Selektion keine Alloreaktivität aufweisen und aufgrund eines breiten Antigenrepertoires für die langfristige Immunrekonstitution wichtig sind. Die Entstehung naiver T-Zellen im Thymus nach der Transplantation dauert meist lange und ist von Alter und Komplikationen sowie dem Auftreten einer GvHD des Empfängers abhängig. [63] Die Rekonstitution der B-Zellen verläuft ebenfalls langsam und eine geringe Zellzahl korreliert mit dem Auftreten von Infektionen [64]. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass trotz normalisierter B-Zellzahlen an Tag 180 nach Transplantation eine verminderte Anzahl an CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen bei den Patienten, die an einer Infektion litten, zu erkennen ist [65]. Ebenso wie das T-Zell-Rezeptorrepertoire, zeigt auch das B-Zell-Antikörperrepertoire eine verzögerte Regeneration von bis zu neun Monaten nach allogener Stammzelltransplantation [66]. Eine GvHD verzögert die Immunrekonstitution einerseits aufgrund der Schädigung lymphatischer Organe wie Thymus und Knochenmark, andererseits werden zur Prophylaxe und Behandlung der GvHD immunsupprimierende Medikamente eingesetzt [67].

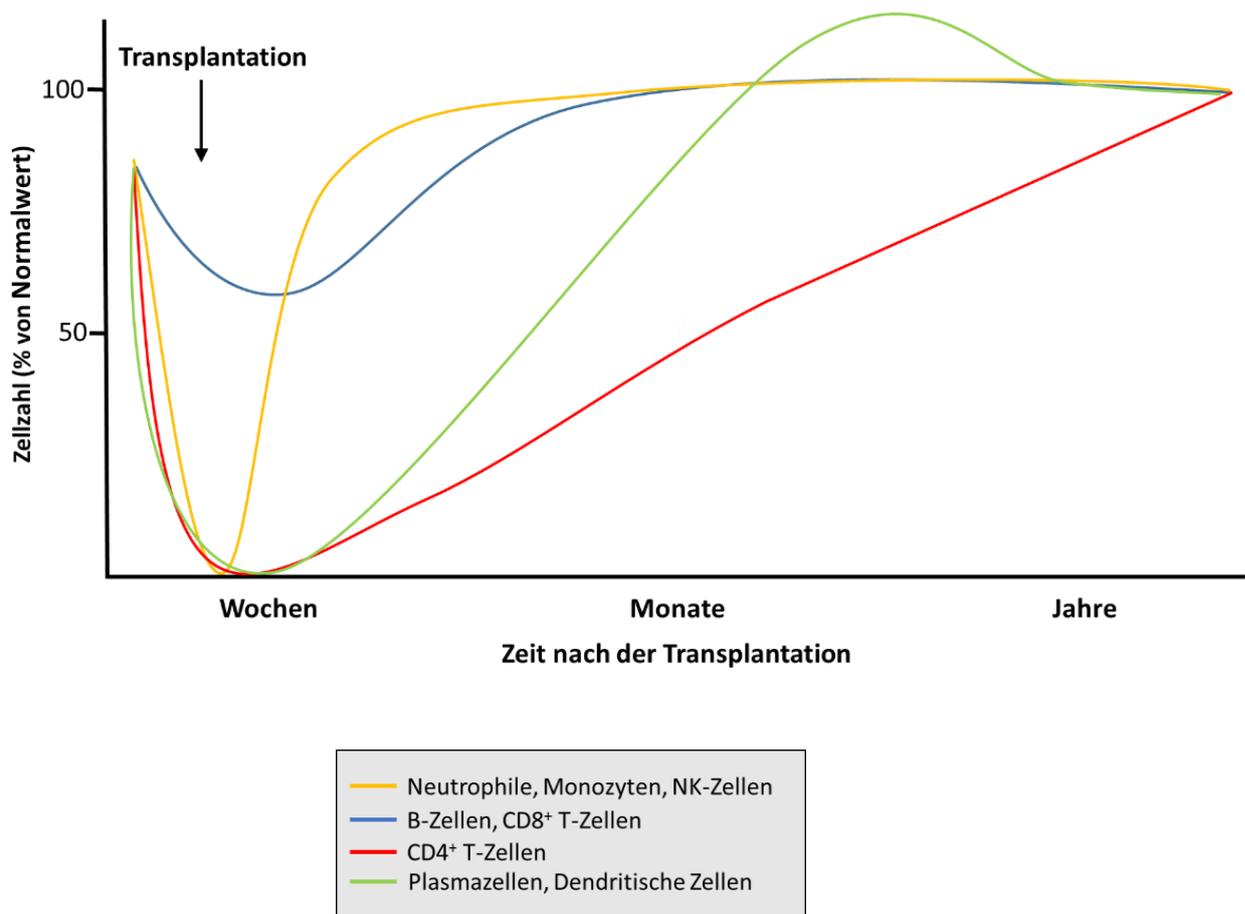


Abbildung 4: Anzahl der Immunzellpopulationen als Anteil des Gleichgewichtszustandes. Ungefähre Zeitspannen von Wochen, Monaten und Jahren nach Transplantation. Adaptiert nach Storek et al. 2008 [19]

Haut, Leber und Darm stellen die klassischen Zielorgane der aGvHD dar. Zudem konnte gezeigt werden, dass auch der Thymus und das Knochenmark wichtige Zielorgane der GvHD sind [68, 69]. Einen Zusammenhang zwischen aGvHD und gestörter Immunrekonstitution stellt insbesondere die aGvHD des Thymus dar, bei der alloreaktive T-Zellen die Strukturen des Thymusgewebes angreifen. Da im Thymus die Entwicklung der T-Lymphozyten stattfindet, was zum einen die Produktion eines breiten T-Zellrepertoires beinhaltet und zum anderen die Entstehung autoreaktiver T-Zellen verhindert, kann die Schädigung dieser Strukturen zu einer Störung des Selektionsprozesses führen und damit zu persistierenden Immundefekten beitragen [69].

Bei der GvHD des Knochenmarks scheinen vor allem nicht-hämatopoetische Zellen wie Osteoblasten und Endothelzellen, welche die Nische des Knochenmarks formen, das Ziel der GvHD zu sein [70]. So konnten Mensen *et al.* eine Korrelation zwischen der gestörten Immunrekonstitution nach allo-HSZT und dem Auftreten einer GvHD, der Infiltration von

Lymphozyten ins Knochenmark sowie einer signifikanten Reduktion der Osteoblasten im Knochenmark herstellen [71]. Die Beeinträchtigung der Knochenmarknische für hämatopoetische Zellen, Plasmazellen sowie T-Gedächtniszellen stellt somit einen wichtigen Grund für die gestörte Immunrekonstitution nach allo-HSZT dar.

Einfluss der Transplantatzusammensetzung auf die Immunrekonstitution

Studien zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung des Stammzelltransplantats und dem klinischen Verlauf von Patienten nach Stammzelltransplantation besteht. Eine höhere Anzahl an B-Zellen im Transplantat beispielsweise korreliert mit einem besseren klinischen Verlauf [72]. Eine erhöhte Anzahl an naiven CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ Effektor-Gedächtniszellen hingegen korrelierte signifikant mit dem Auftreten einer akuten GvHD höheren Grades [9, 19]. Auch ein hoher Anteil an CD4⁺ CCR7⁺ Zellen insgesamt im Transplantat erhöht die Inzidenz und Schwere der akuten Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung [73].

Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass Antigen-erfahrene Gedächtnis-B- und -T-Zellen, die mit dem Stammzelltransplantat transferiert werden, zu einem verbesserten Immunstatus des Empfängers in den ersten Monaten nach Transplantation führen [1, 2]. Bei CMV-positiven Patienten konnte beispielsweise ein klinischer Vorteil verzeichnet werden, wenn sie ein Transplantat von CMV-positiven Spendern im Gegensatz zu sero-negativen Spendern erhielten [74, 75]. Anschließende Studien zeigten, dass die übertragenen Gedächtniszellen vom Spender im Empfänger persistieren und die Frequenz von CMV-Reaktivierungen bzw. Neuinfektionen verringern [4]. Auch konnte gezeigt werden, dass die klinische Anwendung von CMV-spezifischen T-Zellen einen effektiven Schutz gegen CMV-Reaktivierungen darstellt ohne eine Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung zu begünstigen [76, 77]. Bereits früh wurde beschrieben, dass Knochenmarktransplantate von vakzinierten Spendern Tetanus-spezifische CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen enthalten und dass diese im Empfänger persistieren [3]. In einem Patienten nach allo-HSZT wurde gezeigt, dass Hämophilus-Influenza Typ B spezifische Gedächtnis-B-Zellen vom Spender beim Empfänger nach Auffrischungsimpfung eine verstärkte Antwort zeigen [2]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Teil der übertragenen Gedächtniszellen die Fähigkeit besitzt, im Empfänger zu bestehen und nach erneuter Stimulation eine Gedächtnis-ähnliche Antwort hervorzurufen.

1.2.4 Stammzellmobilisierung mit G-CSF

G-CSF wird bei allogenen Stammzellspenden genutzt um die Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut zu mobilisieren. Dies erlaubt die Absammlung peripherer hämatopoetischer Stammzellen.

Wirkmechanismus von G-CSF

Hämatopoetische Stammzellen haben im Knochenmark eine Nische, die Wachstum, Überleben und Differenzierung reguliert. Durch G-CSF kommt es zu einer Veränderung der Knochenmarknische, die dazu führt, dass die hämatopoetischen Stammzellen nicht mehr in der Nische gehalten werden, sondern in das periphere Blut migrieren. Zu den Faktoren, die die Retention von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark vermitteln, zählen unter anderem die Interaktion von VLA-4 (*very late antigen-4*) und VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) sowie die Interaktion von CXCR4 und dem Chemokinliganden CXCL12 (auch engl. *stromal cell derived factor 1*, SDF1). [78-81]

Durch die Einwirkung von G-CSF steigt die Anzahl der neutrophilen Granulozyten und deren Vorläufer an. Dies führt zu einer vermehrten Freisetzung der durch die Granulozyten produzierten proteolytischen Enzyme neutrophile Elastase, Cathepsin G und Matrix-Metalloproteinase-9 und damit zu einem Abbau der Retentionsfaktoren VCAM und CXCL12 im Knochenmark [78, 79, 81, 82]. Durch die Stimulation von CD169⁺ Makrophagen des Knochenmarks, des peripheren sympathischen Nervensystem, sowie von Osteomakrophagen und Osteozyten kommt es zudem zu einem Abbau von Osteoblasten und damit zu einer verminderten Produktion von CXCL12 [81]. Des Weiteren ist beschrieben, dass G-CSF die Komplementkaskade aktiviert, was dazu führt, dass das Lipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P) durch Erythrozyten in das Plasma freigesetzt wird [81, 83]. Dieses wirkt als Chemokin auf die Stammzellen und führt durch den Gradienten zwischen peripherem Blut (hohe S1P Konzentration) und Knochenmark (geringe S1P Konzentration) zu einer Migration der Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. Eine Zunahme von S1P im Blut konnte jedoch bisher nur im Mausmodell und nicht im Menschen nachgewiesen werden [81, 83, 84].

Zusammenfassend kommt es durch G-CSF zu einer Veränderung der Mikroumgebung im Knochenmark, welche weniger attraktiv für die hämatopoetischen Stammzellen ist und, unterstützt durch den S1P Gradienten, zu einer Migration der Stammzellen in das periphere Blut führt [81, 85, 86].

Einfluss von G-CSF auf die Transplantatzusammensetzung

G-CSF kann sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die Zusammensetzung und Funktionalität der Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut haben. Inwieweit ein direkter Effekt von G-CSF auf die Lymphozyten besteht, ist umstritten. So wurde die Expression des G-CSF Rezeptors auf myeloiden Vorläuferzellen, sowie auf reifen neutrophilen Granulozyten und Monozyten schon früh beschrieben, auf eosinophilen Granulozyten, auf erythroiden Zellen sowie auf Lymphozyten wurde der G-CSF Rezeptor jedoch nicht nachgewiesen [87, 88]. In anderen Studien wurde gezeigt, dass G-CSF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Typ 2-T-Helferzellen Phänotyp und eine GATA3-Expression induziert [89]. Entgegen der allgemeinen Auffassung, dass G-CSF nur indirekt über Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen wirkt, konnte hier gezeigt werden, dass auch T-Zellen einen G-CSF Rezeptor tragen und dass dieser durch G-CSF induzierbar ist [89].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die beeinträchtigte Immunrekonstitution stellt eine wichtige Ursache für Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation dar. Es gibt Hinweise darauf, dass mit dem Transplantat vom Stammzellspender übertragene Gedächtnis-T-Zellen zum Immunschutz des Empfängers beitragen. Die Mobilisierungsbehandlung der Stammzellspender mit G-CSF beeinflusst die Zusammensetzung des Transplantats. Es ist außerdem bekannt, dass das Knochenmark eine wichtige Nische für potente Gedächtnis-T-Zellen darstellt.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob Gedächtnis-T-Zellen durch G-CSF aus peripheren Geweben mobilisiert werden und in diesem Zusammenhang insbesondere das Knochenmark als Quelle der mobilisierten Gedächtnis-T-Zellen betrachtet werden kann. Es soll zudem analysiert werden, wie die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen beim Stammzellspender durch G-CSF hinsichtlich phänotypischer und funktioneller Eigenschaften verändert wird. Des Weiteren sollen erste Untersuchungen bezüglich des Verlaufs und der funktionellen Eigenschaften der T-Zell-Populationen im Transplantatempfänger nach der Transplantation erfolgen. Diese Untersuchungen tragen zu einem detaillierten Verständnis der Immunrekonstitution der T-Zell-Populationen nach allogener Stammzelltransplantation bei, welches notwendig ist, um auf der einen Seite Komplikationen wie Infektionen und *Graft-versus-Host Disease* zu verhindern und auf der anderen Seite gewünschte Effekte wie den *Graft-versus-Leukemia*-Effekt zu verstärken und neue Therapien zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probanden

2.1.1.1 Stammzellspender

Es wurden 15 erwachsene Stammzellspender, die im Zeitraum vom 01.01.2016 bis 31.12.2016 in der Stem Cell Facility der Charité Universitätsmedizin Berlin eine Apherese peripherer Stammzellen erhielten, in die Studie eingeschlossen. Die Probanden wurden im Vorfeld der Blutentnahme und der anschließenden Untersuchung durch das ärztliche Personal aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein entsprechendes Ethikvotum liegt vor (EA4/069/13).

Die Spender wurden über vier Tage mit Lenograstim (Granocyte 13/34) zur Stammzellmobilisation behandelt. Die Dosierung erfolgte gewichtsadaptiert und betrug ca. 10 µg/kg Körpergewicht/Tag. Es erfolgte die subkutane Applikation zweimal täglich im Abstand von zwölf Stunden über vier Tage. Am fünften Tag, welcher dem Tag der Apherese entspricht, wurde eine Spritze am Morgen appliziert. Proben von jeweils 20 ml peripheren Blutes wurden am Tag der Voruntersuchung und nach Gabe von Lenograstim am Tag der Stammzellspende gewonnen. Es wurden sowohl Familienspender (n=10) als auch Fremdspender (n=5) untersucht. Bei den Familienspendern wurden zudem die entsprechenden Stammzellempfänger untersucht. Nicht bei allen Probanden wurden sämtliche Untersuchungen durchgeführt.

2.1.1.2 Hüft-TEP-Patienten

Für den Vergleich der Immunzellpopulationen zwischen Knochenmark und peripherem Blut wurden Proben von acht Patienten genommen, bei denen an der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité Campus Virchow Klinikum eine Hüftkopftotalendoprothese (Hüft-TEP) implantiert wurde. Die Aufklärung der Patienten über die Studie erfolgte durch das ärztliche Personal und die Patienten gaben vor der Entnahme des Blutes und der am Folgetag stattfindenden Operation ihr schriftliches Einverständnis. Ein entsprechendes Ethikvotum zu der Studie liegt vor (EA1/269/14). Am Tag vor der Operation wurde den Patienten 20 ml peripheres Blut entnommen. Der bei der Operation entnommene Hüftkopf wurde am Tag der Operation aufgearbeitet. Die Operation erfolgte durch Dr. Jörg Schröder und die Hüftköpfe wurden von Sonya Becker präpariert. Nicht bei allen Probanden wurden sämtliche Untersuchungen durchgeführt.

2.1.1.3 Transplantatempfänger

Es wurden zehn erwachsene Patienten untersucht, die vom 01.01.2016 bis 31.12.2016 in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie am Campus Virchow Klinikum der Charité Universitätsmedizin Berlin eine allogene Stammzellspende von einem Geschwisterspender (*matches related donor*, MRD) erhielten. Die Patienten wurden vor der ersten Blutabnahme durch das ärztliche Personal aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Ein entsprechendes Ethikvotum liegt vor (EA4/128/09). Es wurde an Tag +2, +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation je 20-30 ml peripheres Blut entnommen. Aus organisatorischen Gründen war es nicht möglich von allen eingeschlossenen Spender zu den geplanten Zeitpunkten Proben zu erhalten. Nicht bei allen Probanden wurden sämtliche Untersuchungen durchgeführt.

Nach Erhalt der Blutproben wurden die Untersuchungen bei allen Probanden und Patienten möglichst zeitnah durchgeführt. Bei wenigen Proben war keine sofortige Bearbeitung möglich. Diese Proben wurden kryokonserviert und für die Untersuchungen aufgetaut.

2.1.2 Untersuchungen an den Geweben Tonsillen, Milz und Thymus

Es wurden durchflusszytometrische Färbungen an ausgewählten Geweben durchgeführt. Die Bereitstellung des Thymusgewebes erfolgte durch das Deutsche Herzzentrum, Berlin. Die Operation wurde von Dr. Mi-Young Cho und die Präparation von Eva Käbisch durchgeführt (EA1/233/09).

Die Bereitstellung des Milzgewebes erfolgte von Prof. Dr. Thomas Dörner und Karin Reiter vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin. Tonsillen-Gewebe erhielten wir von Prof. Dr. Alexander Scheffold und Petra Bacher vom Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin.

2.1.3 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Abzug Airflow Control	Arge, Wathlingen, Deutschland
Brutschrank Forma Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer LSR Fortessa™	Becton Dickinson, Kalifornien, USA
Gefrierschrank -80 °C UF755G	Dometic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Gefrierschrank Premium NoFrost GN2553	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühl-Gefrierschrank-Kombination	Siemens, Berlin/München, Deutschland
Kühl-Gefrierschrank-Kombination KGK2833	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikropipetten (0,5-10, 10-100, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop BX 300	Will, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Labovort	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Nalgene® 1 °C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Pipettierhilfe Pipetus® Akku	HirschmannLaborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank HERAsafe® (Klasse II)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Sterilbank LaminAir 2010 1.2 (Klasse II)	Heto-Holten, Allerød, Dänemark

Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad WBT12	Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zellzählkammer Neubauer (0,1 mm/0,0025 mm ²)	Laboroptik, Lancing, United Kingdom
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, US
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
LS Säulen	Miltenyi Biotec

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Kryotubes (1.6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
EDTA-Röhrchen Vacutainer® (10 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Heparinröhrchen Vacutainer® (10 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Konische Zentrifugenröhrchen Falcon® (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Kulturröhrchen (14 ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) Falcon®	BD Biosciences, New Jersey, USA
Transferpipette (3.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb (100 µm) Falcon®	BD Biosciences, New Jersey, USA

Tabelle 3: Reagenzien und Chemikalien

Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Biocoll Trennlösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Flebogamma, humanes IgG	BioTest, Dreieich, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Flow	BD Biosciences, New Jersey, USA
FACS Rinse	BD Biosciences, New Jersey, USA
FCS (hitze-inaktiviert)	PAA, New Jersey, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
PBS (1x) Dulbecco	PAA, New Jersey, USA
Propidiumiodid	Biologend, California, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
anti-PE Microbeads	Miltenyi Biotec

Tabelle 4: Kits

CompensationBeads, anti-mouse Igk	BD Biosciences, New Jersey, USA
Annexin-V FITC Apoptose Kit	BD Biosciences, New Jersey, USA
eBioscience™ Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA

Tabelle 5: Puffer und Medien

Einfriermedium	IBM, 40 % FCS Serum, 10 % DMSO
FACS-Puffer	1xPBS, 2 % Flebogamma
Stimulationsmedium	IMDM, 10 % FCS Serum, 1 % P/S

Tabelle 6: Fluochrom-konjugierte anti-humane Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Verdünnung
CD3	V500	BD	SP34-2	1:80
CD3	Pacific Blue	BD	UCHT1	1:80
CD3	PerCP/Cy5.5	Biolegend	37895	1:80
CD3	APC	Biolegend	SK-7	1:80
CD4	AF700	Biolegend	RPA-T4	1:100
CD8	BV650	BD	RPA-T8	1:80
CD8	BV711	Biolegend	SK1	1:80
CD8	PerCP/Cy5.5	Biolegend	SK1	1:80
CD8	PE	Biolegend	PC61	1:80
CD45RA	PE-Cy5	Biolegend	HI100	1:400
CD69	FITC	Biolegend	FN50	1:40
CD95	PE-Cy7	Biolegend	DX2	1:80
CD103	APC	Biolegend	Ber-ACT8	1:80
CD196 (CCR6)	APC/Cy7	Biolegend	G034E3	1:40
CD197 (CCR7)	Pacific Blue	Biolegend	G043H7	1:100
CD294 (CRTH2)	BV605	Biolegend	BM16	1:80
CLA	APC Vio 770	Miltenyi Biotec	HECA-452	1:100
CCR10	APC	Miltenyi Biotec	REA326	1:80
HLA-DR	PerCP Cy5.5	Biolegend	L243	1:80
CXCR3	FITC	R&D	49801	1:20
Ki67	FITC	Miltenyi Biotec	REA183	1:10
HNP 1-3	Biotin	Hycult Biotech	D-21	1:100
IgG1	PE	Hycult Biotech	MOPC-21	1:50
$\alpha_4\beta_7$ -Integrin	Biotin	-	-	1:100
Life Dead	Pacific Orange	eBioscience	-	1:100
Streptavidin	PE	-	-	1:200
Streptavidin	Pacific Blue	-	-	1:100
CD19	PE	BD	HIB19	1:20
CD114	PE	Biolegend	LMM741	1:80
IgG1 Isotype	PE	Biolegend	MOPC-21	1:40

* Es erfolgte die freundliche Bereitstellung durch das HIV-Konsortium des Deutschen-Rheumaforschungszentrums.

2.1.5 Software

Tabelle 7: Software

FACSDiva TM Software Version 6.2	BD Biosciences, New Jersey, USA
FlowJo Version 10.0.8	Tree Star, Oregon, USA
GraphPad Prism Version 6.0	GraphPad Software, Kalifornien, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von PBMC und BMDC

Zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der mononukleären Zellen wurden diese mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) sowie aus dem Knochenmark (engl. *bone marrow mononuclear cells*, BMDC) gewonnen. Für die Gewinnung von PBMC wurde frisches EDTA- und Heparin-Blut genutzt, für die Isolation von BMDC wurden die Zellen aus frisch entnommenen Hüftköpfen gewonnen. Für die Auftrennung wurde eine Biocoll-Trennlösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) verwendet. Durch die spezifische Dichte der Trennlösung von 1,1 g/ml erfolgt bei Zentrifugation die Trennung der Blutkomponenten entsprechend ihrer spezifischen Dichte. Durch ihre höhere Dichte finden sich Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen am Boden, mononukleäre Zellen (B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und NK-Zellen) hingegen sammeln sich auf der Trennlösung unterhalb der oben aufliegenden Plasmaschicht.

Für die Isolation wurde das frische Vollblut unter sterilen Bedingungen 1:1 mit PBS auf ein Endvolumen von 35 ml verdünnt. Die Knochenmarkszellen der Hüftköpfe wurden mit einem sterilen Metalllöffel isoliert, in 25 ml warmes IMDM, 10 % FCS Serum, 1 % P/S überführt und 10 bis maximal 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellsuspension wurde über einen 100 µm Filter in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und ebenso auf 35 ml mit PBS aufgefüllt. Die Suspension wurde dann auf 15 ml Biocoll-Trennlösung gegeben und für 15 Minuten mit 2000 Umdrehungen pro Minute (UpM) ohne Dezeleration bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMC wurden aus der Trennschicht zwischen Plasma und Biocoll-Schicht mit einer Transferpipette abgenommen. Die Zellen wurden dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1300 UpM, ebenfalls bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und die Zellzahl durch Anfärben mit Trypanblau in der Zellzählkammer von Neubauer (0,1 mm/0,0025 mm²) unter dem Lichtmikroskop ermittelt. Entsprechend der Zellzahl wurden die Zellen aufgeteilt, erneut bei 1300 UpM und RT zentrifugiert und im Anschluss zur Blockierung von Fc-Rezeptoren in PBS-Flebogamma resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert.

2.2.2 Kryokonservierung von PBMC und BMDC

Zur Kryokonservierung der PBMC und BMDC wurden diese in einer Dichte von 10⁶ Zellen/ml mit 4°C kaltem Einfriermedium (IMDM, 40 % AB Serum, 10 % DMSO) resuspendiert und mit einem Volumen von jeweils einem ml in Kryotubes gefüllt. Für den Einfrier-Prozess wurden die

Kryotubes in vorgekühlte Isopropanol-Einfriercontainer gestellt und dann bei -80°C gelagert und im Verlauf bei längerer Lagerung in Stickstofftanks aufbewahrt.

2.2.3 Phänotypische Charakterisierung von T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Prinzip der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die physikalischen Eigenschaften Größe und Granularität einer Zelle sowie extrazelluläre und intrazelluläre Antigene mittels Fluorochrom-konjugierter Antikörper detektiert. Ein Laser sendet monochromatisches Licht auf eine lichtdurchlässige Küvette, durch die ein Flüssigkeitsstrom mit je einer Zelle durchgeleitet wird. Die nach vorne abgelenkten Strahlen geben Auskunft über die relative Größe der Zellen (engl. *Forward Side Scatter*, FCS). Anhand des im 90°-Winkel durch intrazelluläre Partikel abgelenkten Streulichts (engl. *Sideward Side Scatter*, SSC) lässt sich die Granularität der Zellen bestimmen.

Bei der Markierung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wird im Durchflusszytometer ein Teil der Lichtenergie des Lasers durch das Fluorochrom absorbiert und Licht höherer Wellenlänge ausgesendet, welches dann durch die Detektoren im Gerät gemessen wird. Durch den Einsatz verschiedener Laser-Wellenlängen, Filter, Spiegel und Detektoren ist es möglich, Fluoreszenzsignale unterschiedlicher Spektren zu messen. Durch Größe und Granularität können die PBMC in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterschieden werden. Durch den Einsatz Fluorochrom-konjugierter Antikörper lassen sich die einzelnen Populationen der Zelltypen unterscheiden. Die Bedienung des Durchflusszytometers erfolgte mithilfe der Software FacsDiva Version 6.2. [90]

Phänotypisierung von T-Zell-Populationen

Durch die systematische Zusammenstellung von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, die zur Markierung von leukozytären Antigenen eingesetzt werden, können mithilfe der Durchflusszytometrie Immunzellpopulationen voneinander abgegrenzt werden.

Intrazelluläre Färbungen

Die intrazellulären Färbungen wurden mit dem *Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set* für die Ki67-Färbungen und dem *Intracellular fixation and permeabilization buffer set* (Affimetrix eBioscience) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Gating-Strategien

Um die definierten T-Zell- Populationen und Subpopulationen zu identifizieren, wurden mithilfe der Antikörper aus Tabelle 6 systematisch zusammengestellte Färbe-Panels eingesetzt. Abbildung 5 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die *Gating*-Strategie zur Identifikation der T-Zellen und der entsprechenden Subpopulationen innerhalb der PBMCs.

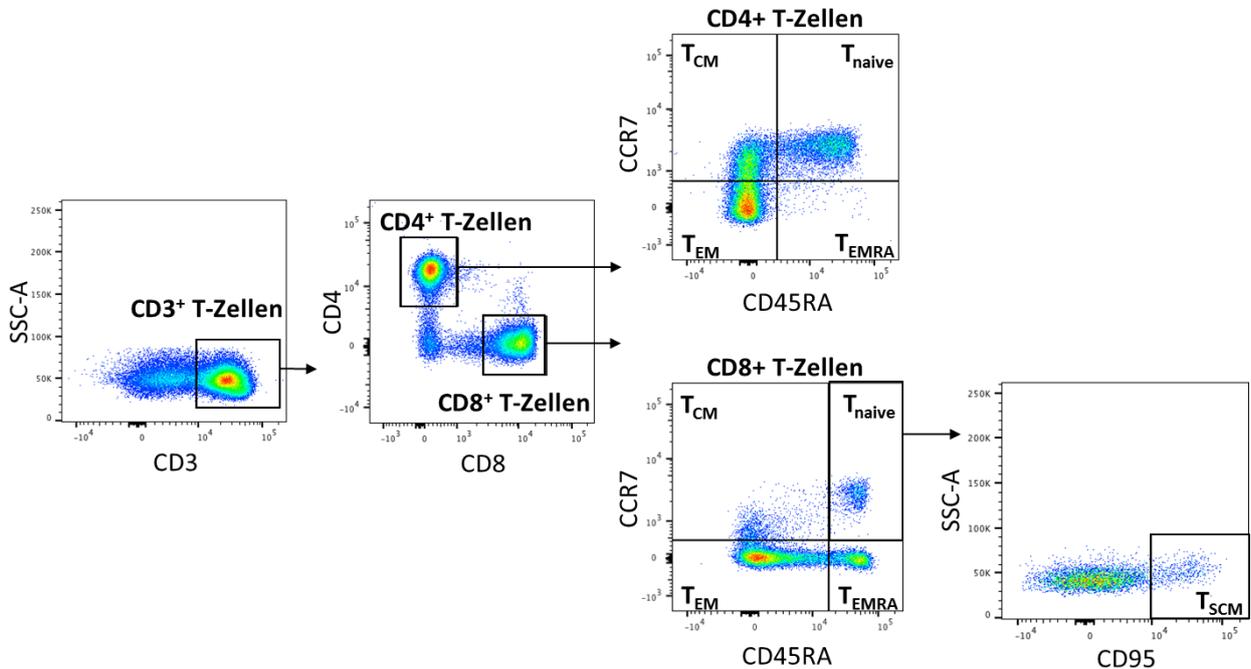


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Identifizierung von T-Zell-Populationen. Die Abbildung zeigt die *Gating*-Strategie zur Abgrenzung der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie der Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Kompartimente. Hier sind beispielhaft die Färbungen der PBMCs gezeigt. Beim Gating der BBMCs wurde analog vorgegangen.

Zunächst wurde durch den Ausschluss von Propidiumiodid-positiven Zellen sichergestellt, dass nur lebende Zellen in die Analysen aufgenommen werden. Zudem wurde durch die Auftragung von FSC-A gegen FSC-H die Erkennung und Exklusion von Zelldubletten und aggregierten Zelltrümmern ermöglicht. Durch die Gegenüberstellung von FSC (Größe) und SSC (Granularität) wurde die Lymphozytenpopulation identifiziert. Anschließend wurden die CD3⁺ T-Zellen ausgewählt und diese in CD4⁺ T-Helfer und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen unterschieden. Für die Abgrenzung der Gedächtniszellen wurde der Marker CD45RA genutzt und die CD45RA⁻ Zellen als Gedächtniszellen definiert. Mithilfe der Gegenüberstellung von CCR7 und CD45RA wurden weitere Subpopulationen unterschieden. CCR7⁺CD45RA⁻ Zellen wurden als zentrale Gedächtnis-T-Zellen (engl. *central memory T cells*, T_{CM}), CCR7⁺CD45RA⁺ als naive T-Zellen (T_{naive}), CCR7⁻CD45RA⁺ als terminal differenzierte Gedächtnis-T-Zellen (engl. *effector memory CD45RA expressing T cells*, T_{EMRA}) und CCR7⁻CD45RA⁻ als Effektor Gedächtnis-T-Zellen (engl. *Effector*

memory T cells, T_{EM}) definiert [6, 7]. Zudem wurden die CD95⁺ naiven Zellen als T_{SCM} gated. Hierbei ist kritisch anzumerken, dass für ein eindeutiges Gating der T_{SCM} eine erweiterte Markerkombination nötig ist (siehe Diskussion 4.2.2).

Die Färbungen für die Gewebemarker CD69, CD103, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CLA, CCR10, CCR6, CXCR3 und CRTH2 sind in Abbildung 6 dargestellt. Beispielhaft sind die Dotplots der Färbungen auf den CD4⁺ T-Zellen der PBMCs dargestellt.

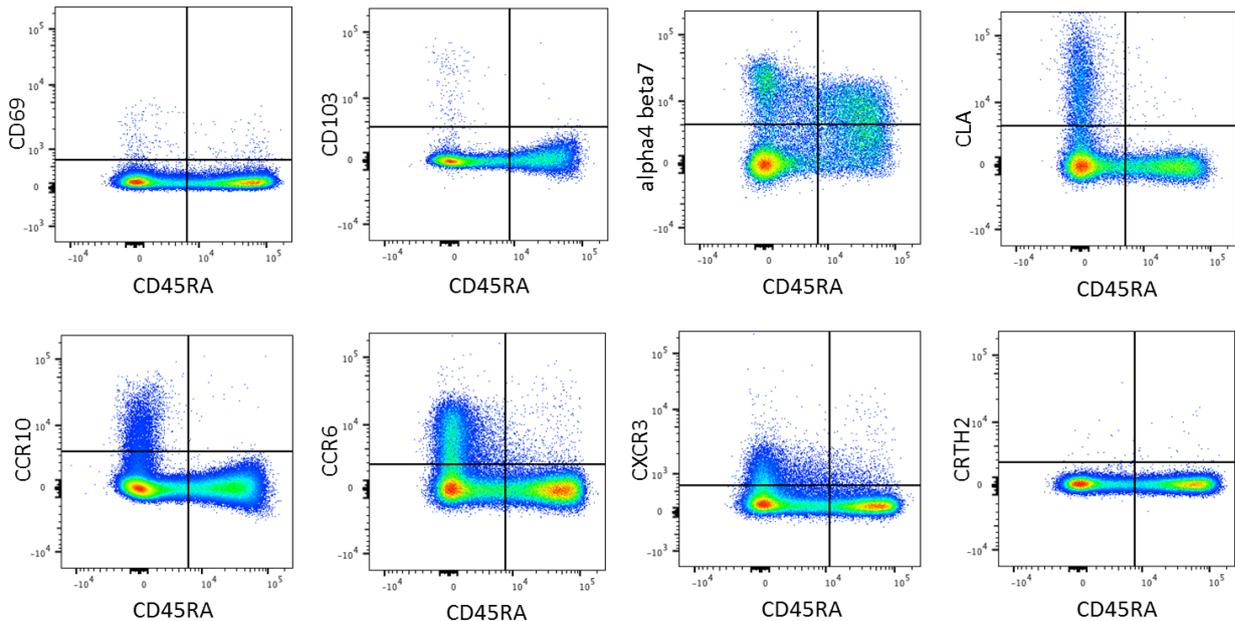


Abbildung 6: **Expression von Gewebemarkern auf CD45RA⁺ Gedächtniszellen.** Die Abbildung zeigt beispielhaft die Expression der untersuchten Gewebemarker auf den CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Dargestellt ist die Expression von CD69, CD103, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CCR10, CCR6, CXCR3 und CRTH2 gegen CD45RA. Auffällig ist die vermehrte Expression auf den CD45RA⁻ Gedächtniszellen bei den Markern CD103, CLA, CCR10, CCR6 und CXCR3. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin zeigt eine diskrete Auftrennung in eine positive und eine negative Population bei den CD45RA⁺ Zellen. Die CD45RA⁺ Zellen zeigen eine intermediäre Expression, es lassen sich keine diskreten Populationen abgrenzen. Die CD69 und CRTH2 Expression ist auf den CD45RA⁺ und CD45RA⁻ Zellen gering.

Für die funktionellen Untersuchungen wurden die Proliferation und die Apoptose-Anfälligkeit der Gedächtniszellen betrachtet. Dazu wurden der Proliferationsmarker Ki67 sowie die Kombination aus Annexin V und Propidiumiodid (PI) zur Unterscheidung in lebende, früh-apoptotische, spät-apoptotische und nekrotische Zellen genutzt. Abbildung 7 zeigt repräsentative Färbungen von Ki67 bzw. Annexin/PI auf CD4⁺ Gedächtniszellen.

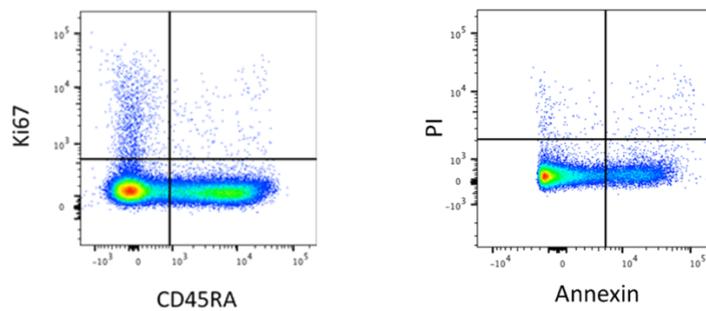


Abbildung 7: Beispielhafte Dotplots zu funktionellen durchflusszytometrischen Messungen. Die Abbildung zeigt den Proliferationsmarker Ki67 in Abhängigkeit von der CD45RA-Expression (links) sowie die Darstellung von PI gegen Annexin zur Untersuchung der Apoptoseneigung (rechts).

2.2.4 Exosomen-Isolation und cDNA Synthese

Die Exosomen wurden aus dem peripheren Blut vor und nach G-CSF Behandlung mit dem *Total Exosome Isolation Reagent Kit* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) isoliert und anschließend die RNA mit dem *Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben extrahiert. Die cDNA wurde mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) generiert. Dazu wurde das Thermocycler Programm auf dem GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems) genutzt und die folgende Einstellung verwendet: 10 min 25°C, 120 min 37°C, 5 min 85°C.

Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR wurde in 96-well MicroAmp® Optical Platten (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) in einem Gesamtvolumen von 13 µl, bestehend aus 2 µl cDNA, 4,25 µl DEPC-behandeltem Wasser, 6,25 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) und 0,5 µl FAM markiertem DEFA1 (Hs00414018_m1) und DEFA3 (Hs00234383_m1) Primer-/Sondenpaar (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für die PCR wurden die folgenden Einstellungen genutzt: 1x (2 min 50°C), 1x (10 min 95°C), 40-50x (15 sec 95°C, 1 min 60°C). Die PCR wurde am 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) durchgeführt. Diese Experimente erfolgten mit Hilfe von Sonya Becker.

2.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 6.0). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.05$ gilt als schwach statistisch signifikant (*), eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0.01$ als signifikant (**). Statistische Signifikanzen wurden mit dem *Wilcoxon matched pairs signed rank Test* berechnet. Die Daten wurden einzeln oder als Mittelwert plus/minus dem Standardfehler angegeben. Zur grafischen Darstellung der Daten wurden mit GraphPad Prism Balken- und Punktdiagramme generiert.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen von G-CSF auf die Transplantatzusammensetzung, vor allem in Hinblick auf die T-Zellpopulationen untersucht werden. Dazu wurden allogene Stammzellspender rekrutiert und Blutproben vor und nach der Behandlung mit G-CSF genommen. Zudem sollte der Vergleich mit T-Zellen aus dem Knochenmark erfolgen. Hierzu wurden Proben aus peripherem Blut und Knochenmark von Patienten, die eine Hüfttotalendoprothese erhalten haben, untersucht. Des Weiteren sollten die T-Zell-Populationen der Stammzellspender im Stammzellempfänger nachverfolgt werden. Dazu wurden Blutproben der entsprechenden Stammzellspender im Verlauf nach der Transplantation analysiert. Im Folgenden sind die Charakteristika dieser einzelnen Probanden bzw. Patientengruppen dargestellt.

3.1 Charakteristika der Spender und Patienten

3.1.1 Charakteristika der Stammzellspender

Es wurden 15 gesunde Stammzellspender in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter der Spendergruppe betrug 50 Jahre (Median 57, Spannweite 23-69 Jahre) mit 6 weiblichen und 9 männlichen Spendern. Alle Spender waren allogene Stammzellspender. Es wurden sowohl Familienspender (n=10) als auch Fremdspender (n=5) untersucht. Bei den Familienspendern wurden zudem die entsprechenden Stammzellempfänger untersucht.

3.1.2 Charakteristika der Hüft-TEP-Patienten

Es wurden 8 Patienten untersucht. Das mittlere Alter der Patientengruppe betrug 63,3 Jahre (Median 63,5 Jahre, Spannweite 51-79 Jahre). Es wurden zwei männlichen Patienten und sechs weibliche Patienten untersucht. Die Indikation zur Implantation einer Hüftkopfdoprothese wurde bei allen Patienten aufgrund einer Hüftkopfarthrose gestellt.

3.1.3 Charakteristika der Stammzellempfänger

Es wurden 10 Stammzellempfänger in die Studie eingeschlossen. Das mittlere Alter der Patientengruppe betrug 53 Jahre (Median 53 Jahre, Spannweite 27-68 Jahre) mit sieben weiblichen und drei männlichen Stammzellempfängern. Die klinischen Charakteristika der Patienten sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Dargestellt sind die klinischen Charakteristika der Stammzellempfänger (Empf.), Alter und Geschlecht der Spender, sowie mit dem Transplantat übertragende CD3⁺ T-Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers.

	Alter Empf.	Geschl. Empf.	Diagnose	Konditionierung	ATG kumulativ (mg/kgKG)	Alter Spender	Geschl. Spender	CD3 ⁺ Zellen im Transplantat (x10 ⁶ /kgKG)
1	65	w	AML	RIC: Fludarabin, Busulfan	40	65	w	628
2	64	w	AML	RIC: Fludarabin, Busulfan	20	62	m	61
3	54	m	AML	FLAMI-RIC	60	57	m	594
4	27	w	ALL	TBI (12Gy), Etoposid (60mg/kgKG)	0	29	m	306
5	52	w	Multiples Myelom	Fludarabin (3x 30mg/kgKG), Melphalan (140 mg/kgKG)	30	60	w	27
6	44	w	AML	RIC: Fludarabin, Busulfan	40	46	m	217
7	48	w	MDS/MPN	RIC: Fludarabin, Busulfan (dosisreduziert)	40	62	w	370
8	47	w	refraktäres DLBCL	RIC: Fludarabin, Busulfan	40	56	w	325
9	68	m	AML	FLAMI-RIC elderly	30	69	w	346
10	58	m	AML	RIC: Fludarabin, Busulfan	40	44	m	226

Erklärung zu den Konditionierungsregimes

RIC (engl. Reduced Intensity Conditioning): beinhaltet die Behandlung mit Fludarabin (6x 30mg/m² Körperoberfläche) und Busulfan (2x 4mg/kg Körpergewicht) bzw. Busulfan dosisreduziert (2x 2mg/kg Körpergewicht)

FLAMI-RIC: beinhaltet die Behandlung mit Fludarabin (4x 30mg/m² Körperoberfläche), AraC (Cytarabin) (4x2000mg/m² Körperoberfläche), Mitoxantron (4x 10 mg/ m² Körperoberfläche), Endoxan (2x60 mg/kg Körpergewicht), TBI 4 Gy (total body irradiation; Ganzkörperbestrahlung mit 4 Gray), Cyclophosphamid (2x 60 mg/kg Körpergewicht) und Mesna (20%, 100% von Cyclophosphamid)

FLAMI-RIC elderly: beinhaltet die Behandlung mit Fludarabin (4x 30mg/m² Körperoberfläche), AraC (4x1000mg/m² Körperoberfläche), Mitoxantron (4x 10 mg/ m² Körperoberfläche), Busulfan (3x 0,8 mg/ kg Körpergewicht) Cyclophosphamid (2x 60 mg/kgKG) und Mesna (20%, 100% von Cyclophosphamid)

Fünf Patienten litten unter einer akuten myeloischen Leukämie (AML). Die Indikation zur Stammzelltransplantation wurde bei diesen Patienten aufgrund einer Hochrisikokonstellation gestellt. Eine Patientin litt unter einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL). Eine weitere Patientin litt unter einem nicht näher klassifizierbaren myelodysplastischen Syndrom bzw. einer myeloproliferativen Neoplasie (MDS/MPN). Die Indikation zur Stammzelltransplantation wurde bei dieser Patientin aufgrund einer hohen Transfusionsfrequenz und eines hohen molekulargenetischen Risikos gestellt.

Alle Patienten erhielten eine Stammzellspende mit peripheren Blutstammzellen (*Peripheral Blood Stem Cells*, PBSC) von einem HLA-identen Geschwisterspender. Die Stammzellen wurden bei

neun Patienten am Tag nach der Absammlung transplantiert. Bei einer Patientin (Patientin Nummer 2) wurden die Stammzellen nach der Absammlung kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt (nach 13 Tagen) transplantiert. Die mittlere Anzahl an mit dem Transplantat übertragenen T-Zellen betrug 310×10^6 Zellen/kg Körpergewicht. Die Patienten, die an einer AML, einem MDS/MPS bzw. an einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom (engl. *diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) erkrankt waren, erhielten eine intensitätsreduzierte Konditionierung mit Fludarabin und Busulfan bzw. Busulfan dosisreduziert oder wurden mit dem Flami RIC Regime bzw. dem Flami RIC elderly Regime konditioniert. Eine Patientin (ALL) erhielt eine klassische Konditionierung mit voller Intensität mittels Bestrahlung (kumulativ 12 Gy) und Etoposid. Eine Patientin (Multiples Myelom) erhielt eine Konditionierung mittels Fludarabin und Melphalan. Zur Prophylaxe einer GvHD wurden neun der zehn untersuchten Patienten an Tag -3, -2 und -1 vor Transplantation mit ATG (Fresenius) behandelt. Es wurden 20-60 mg/kg Körpergewicht ATG kumulativ verabreicht.

3.2 Ergebnisse Stammzellspender

3.2.1 T-Zell-Populationen und Subpopulationen

Im Folgenden werden die Veränderungen der Lymphozyten-Populationen sowie der Subpopulationen durch G-CSF und die Veränderungen in der Expression der Gewebemarker beim Stammzellspender gezeigt. Zum Vergleich sind die entsprechenden Ergebnisse aus den Untersuchungen der Patienten, deren peripheres Blut und Knochenmark analysiert wurde, dargestellt.

T-Zell-Populationen

Die absoluten Zellzahlen der Lymphozyten der Stammzellspender wurden im Rahmen der Voruntersuchung in der Stem Cell Facility der Charité sowie am Tag der Stammzellspende durch ein Differentialblutbild bestimmt. Die Bestimmung am Tag der Spende erfolgte nach Applikation von G-CSF und vor der Entnahme der Stammzellen.

Vor Behandlung mit G-CSF betrug die mittlere Lymphozytenzahl $1712/\mu\text{l}$ (Spannbreite $1050-2220/\mu\text{l}$). Nach Behandlung mit G-CSF zeigte sich ein Anstieg der absoluten Lymphozytenzahl auf $4625/\mu\text{l}$ (Spannbreite $3180-6650/\mu\text{l}$). Die Berechnung der absoluten Zellzahlen der jeweiligen Lymphozytenpopulationen im Folgenden beruht auf den Lymphozytenzahlen im Differentialblutbild.

Zunächst wurden die quantitativen und qualitativen Veränderungen der CD3⁺ T-Zellen, der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie der Gedächtniszellen und der Subpopulationen (T_{EM}, T_{naive}, T_{EMRA} und T_{CM}) betrachtet.

Die absoluten Zellzahlen der CD3⁺, sowie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor und nach Behandlung mit G-CSF sind in Abbildung 8 dargestellt. Es zeigte sich bei allen Populationen eine signifikante Zunahme der Zellen im peripheren Blut nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Die mittlere Anzahl der CD3⁺ T-Zellen stieg um das 2,6-fache von 1330/μl auf 3487/μl. Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen stieg um das 2,4-fache von 827/μl auf 1984/μl und die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen um das 3-fache von 370/μl auf 1121/μl.

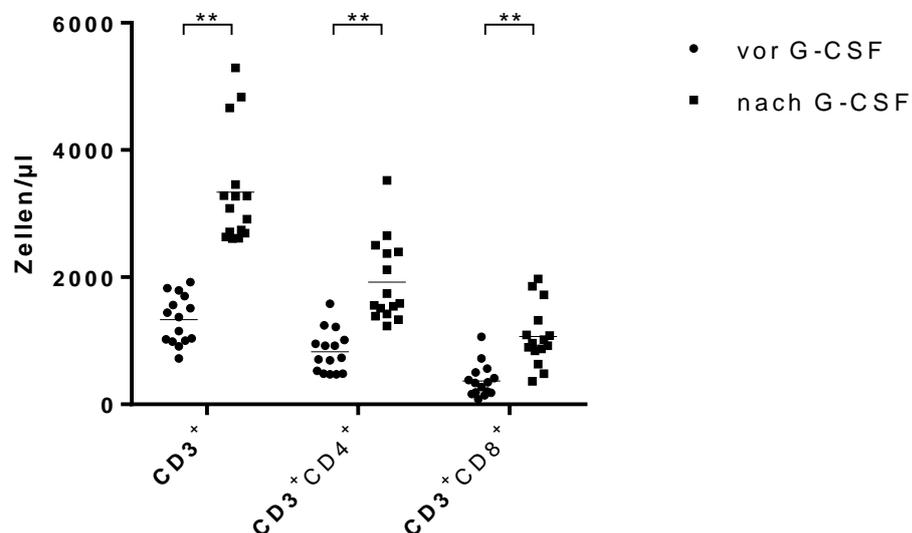


Abbildung 8: Absolute Zellzahlen der CD3⁺ T-Zellen sowie der CD4⁺ T-Helfer und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Absolute Zellzahlen pro μl Blut der Stammzellspender vor Behandlung mit G-CSF sind als Kreise, Zellzahlen der entsprechenden Stammzellspender nach Behandlung mit G-CSF sind als Quadrate dargestellt. Striche kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=15, **p≤0,01

Die prozentuale Verteilung der CD3⁺ T-Zellen innerhalb der Lymphozyten sowie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ T-Zellen zeigte geringe, jedoch signifikante Veränderungen nach der Behandlung mit G-CSF, welche in Abbildung 9 dargestellt sind. So wurde eine signifikante Abnahme des mittleren Anteils der CD3⁺ T-Zellen an den Lymphozyten von 77% vor Behandlung mit G-CSF auf 71% nach Behandlung mit G-CSF beobachtet. Der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen an den CD3⁺ Zellen zeigte eine signifikante Abnahme der CD4⁺ Zellen von 50,5% auf 42,9% und eine signifikante Zunahme der CD8⁺ Zellen von 18,2% auf 21,6%. Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ änderte sich damit zugunsten der CD8⁺ Population von 2,8 vor G-CSF auf 2,0 nach G-CSF.

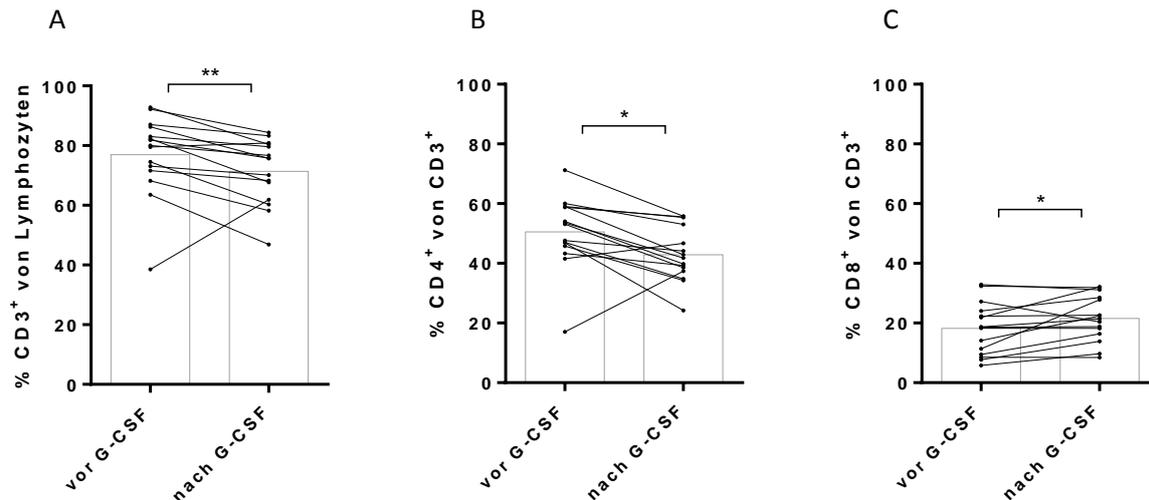


Abbildung 9: Anteil der CD3⁺ T-Zellen an den Lymphozyten und Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen an der CD3⁺ T-Zell-Population vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. CD3⁺ Zellen sind als prozentualer Anteil der Lymphozyten dargestellt (A). Der Anteil der CD4⁺ (B) und CD8⁺ (C) Zellen bezieht sich auf die CD3⁺ Zellen. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=15, *p≤0,05, **p≤0,01

Im Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil von CD3⁺ Zellen an den Lymphozyten im Knochenmark (38,7%) als im peripheren Blut (75,9%) (Abbildung 10). Der Anteil der CD4⁺ Zellen an den CD3⁺ T-Zellen war im Knochenmark (54,5%) signifikant geringer als im Blut (73,1%), wohingegen der Anteil an CD8⁺ Zellen signifikant höher war als im Blut (31,5% vs. 18,4%).

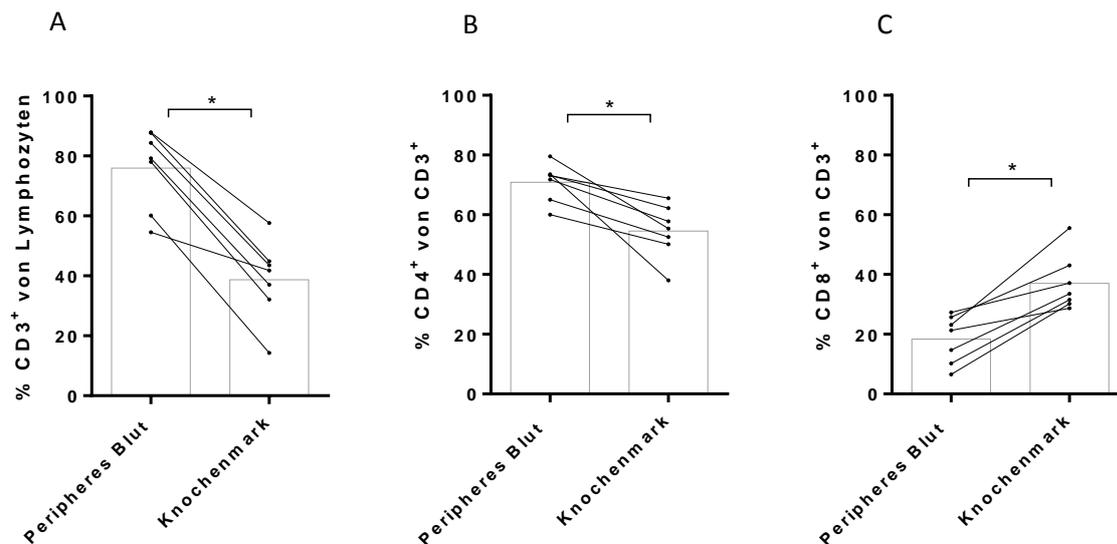


Abbildung 10: Anteil der CD3⁺ T-Zellen an den Lymphozyten und Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen an der CD3⁺ T-Zell-Population im peripheren Blut und im Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. CD3⁺ Zellen sind als prozentualer Anteil der Lymphozyten dargestellt (A). Der Anteil der CD4⁺ (B) und CD8⁺ (C) Zellen bezieht sich auf die CD3⁺ Zellen. Es wurden gepaarte Proben vom peripheren Blut und Knochenmark der jeweiligen Patienten untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=7, *p≤0,05

Der Vergleich zeigt, dass sich durch die Behandlung mit G-CSF die Verteilung der Populationen im peripheren Blut der Verteilung im Knochenmark annähert. Sowohl nach G-CSF als auch im Knochenmark waren im Vergleich zum peripheren Blut ohne Behandlung prozentual weniger CD3⁺ T-Zellen in den Lymphozyten vorzufinden. Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen nahm nach Behandlung mit G-CSF ab und zeigte sich auch im Knochenmark geringer als im peripheren Blut. Vergleicht man die Kohorte der Stammzellspender mit der Kohorte der Patienten, die eine Hüft-TEP-Operation erhalten haben, so zeigt sich, dass die Expression von CD3 und CD8 im peripheren Blut vergleichbar war. Der Anteil der CD4⁺ Zellen an den T-Zellen im peripheren Blut der Hüft-TEP-Patienten hingegen war höher als bei den unbehandelten Stammzellspendern.

Subpopulationen

Betrachtet man die absoluten Zellzahlen der Gedächtniszellpopulationen, so kam es zu einer signifikanten Zunahme sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Gedächtniszellen im peripheren Blut der Stammzellspender nach der Applikation von G-CSF. Es war ein Anstieg der CD4⁺CD45RA⁻ Zellen von im Mittel 473 Zellen/μl auf im Mittel 993 Zellen/μl (2,1-fach) zu verzeichnen. Die CD8⁺CD45RA⁻ Zellen stiegen von im Mittel 153 Zellen/μl auf 446 Zellen/μl (2,9-fach).

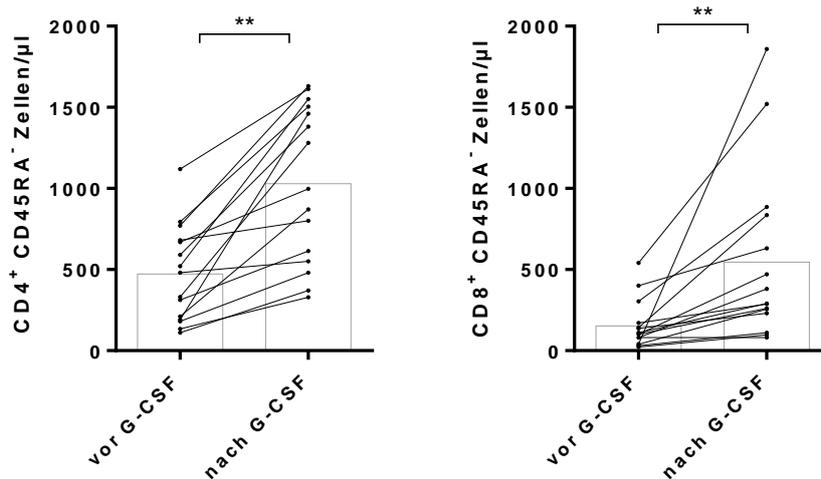


Abbildung 11: Absolute Zellzahlen der CD4⁺ und CD8⁺ CD45RA⁻ Gedächtnis T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=15, **p≤0,01

Der prozentuale Anteil der CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zeigte im Vergleich vor und nach G-CSF eine signifikante Abnahme der CD45RA⁻ Gedächtniszellen an den CD4⁺ T-Zellen von im Mittel 55,6% auf 49,8% (Abbildung 12). Der Anteil der CD8⁺CD45RA⁻ Gedächtniszellen an den CD8⁺ T-Zellen betrug vor G-CSF 47,4% und nach G-CSF 42,6%.

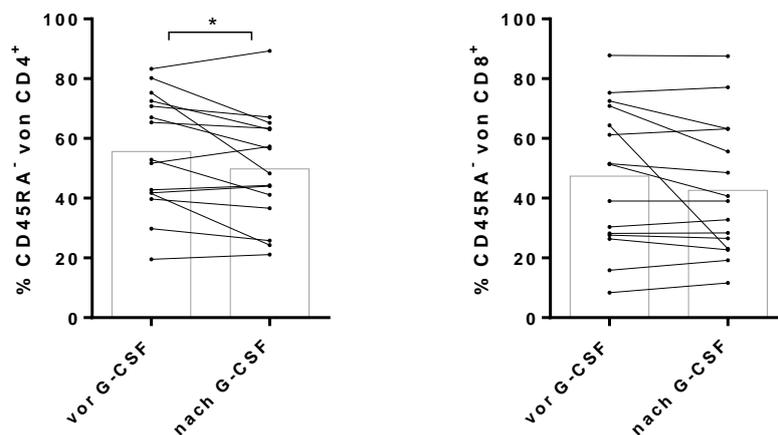


Abbildung 12: Anteil der CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=15, *p≤0,05

Im Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der Anteil an CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen betrug im Blut 71,6% und im Knochenmark 66,5%. Bei den CD8⁺ Zellen zeigte sich im Blut ein Anteil von 68,6% CD45RA⁻ Zellen und im Knochenmark ein Anteil von 66,8% (Abbildung 13).

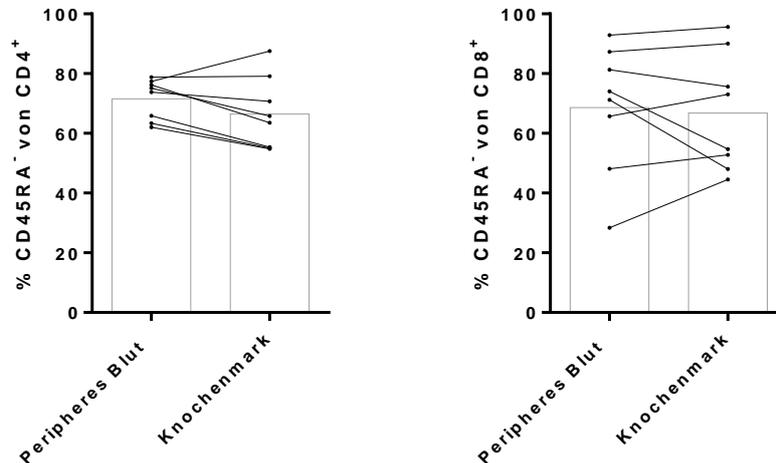


Abbildung 13: Anteil der CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. Es wurden gepaarte Proben vom peripheren Blut und Knochenmark der jeweiligen Patienten untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=8

Es wurden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des Weiteren in die vier Subpopulationen T_{CM}, T_{EM}, T_{naive} und T_{EMRA}-Zellen unterschieden (Abbildung 14). Bei den CD4⁺ T-Zellen veränderten sich die Anteile an T_{CM}, T_{naiven} und T_{EMRA} T-Zellen nicht signifikant (Abbildung 14). Es kam jedoch zu einer signifikanten Abnahme der T_{EM} von 36,2% auf 29,1 %. Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der naiven T-Zellen (23,6% auf 27,2%). Der Anteil der T_{CM}, T_{EMRA} und T_{EM} veränderte sich nicht signifikant.

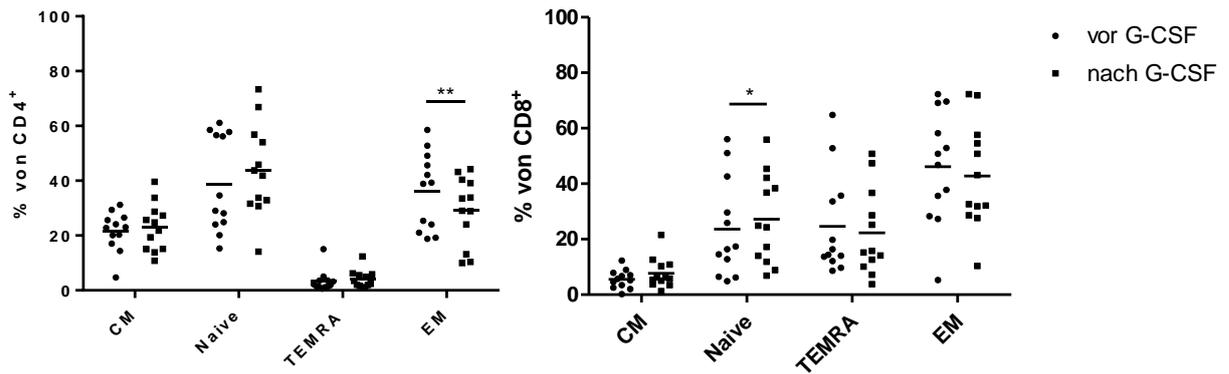


Abbildung 14: Anteil der Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Werte der Stammzellspender vor Behandlung mit G-CSF sind als Kreise, Werte der entsprechenden Stammzellspender nach Behandlung mit G-CSF sind als Quadrate dargestellt. Striche kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=12, *p≤0,05, **p≤0,01

Beim Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark war die Verteilung der Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 15).

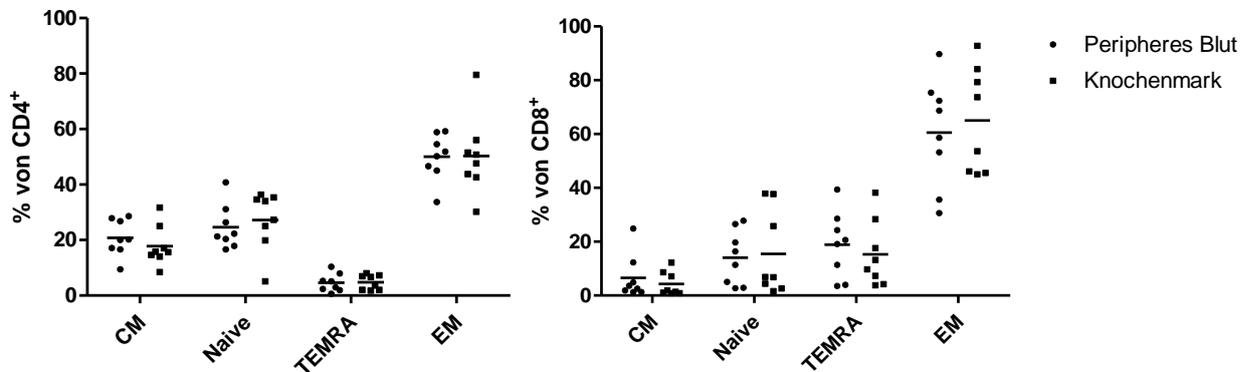


Abbildung 15: Anteil der Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. Werte der Zellen aus dem peripheren Blut sind als Kreise, Werte der entsprechenden Färbungen an Knochenmarkszellen sind als Quadrate dargestellt. Striche kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=8

CD45RA⁻CCR7⁺CD95⁺ (T-Gedächtnis-Stammzellen)

CD95⁺ naive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden in der Literatur als T-Gedächtnis-Stammzellen (engl. *stem memory T cells*, T_{SCM}) beschrieben und diesen Zellen stammzellähnliche Charakteristika zugeordnet [14, 15]. Um die Frage zu beantworten, ob diese Zellen durch G-CSF vermehrt mobilisiert werden, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen zu dieser Population durchgeführt. Dabei zeigte sich prozentual keine signifikante Veränderung bei den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut durch Behandlung mit G-CSF (Abbildung 16).

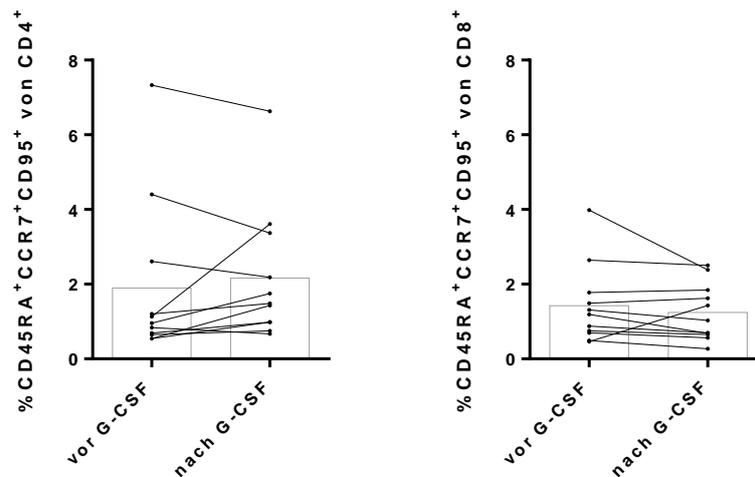


Abbildung 16: Anteil der CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺ (T_{SCM}) Zellen an den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=10

Beim Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 17).

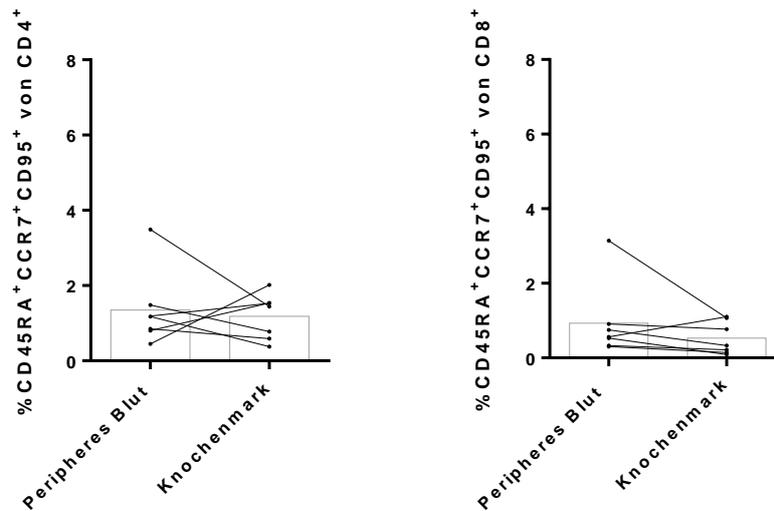


Abbildung 17: Anteil der CD45RA⁺CCR7⁺CD95⁺ (T_{SCM}) Zellen an den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. Es wurden gepaarte Proben vom peripheren Blut und Knochenmark der jeweiligen Patienten untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=6

3.2.2 Apoptoseneigung der Gedächtnis-T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Gedächtnis-T-Zellen der Stammzellspender sich in ihrer Viabilität nach der Behandlung mit G-CSF verändern, wurden die Zellen mit Annexin-V (Ann.-V) und Propidiumiodid (PI) markiert und im Anschluss durchflusszytometrisch gemessen. Mithilfe dieser Untersuchung können Zellen in Annexin-V⁻PI⁻ lebende Zellen, Annexin-V⁺PI⁻ früh-apoptotische Zellen, Annexin-V⁺PI⁺ spät-apoptotische und Annexin-V⁻PI⁺ nekrotische Zellen unterschieden werden.

Das Prinzip der Annexin-V und Propidiumiodid-Färbung beruht auf der Tatsache, dass es bei Zellen im früh-apoptotischen Stadium zu einer Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran kommt. Die Translokation führt *in vivo* dazu, dass Makrophagen das Phosphatidylserin erkennen und die entsprechenden Zellen phagozytieren, bevor es zur Nekrose kommt und zelluläre Proteasen abgegeben werden, die zu Entzündungsreaktionen führen. *In vitro* wird dieser Mechanismus genutzt um die Apoptoseneigung der Zellen zu bestimmen. Annexin-V ist ein Ca²⁺-abhängiges Protein, welches Phospholipide bindet und eine hohe Affinität für Phosphatidylserin aufweist. Damit zeigt die Färbung den Anteil an früh-apoptotischen Zellen an. Durch die PI-Färbung werden diese von spät-apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen unterschieden. Da im nekrotischen Stadium ein Verlust der Zellmembran-Integrität vorliegt, kann

der DNA-Farbstoff PI die Membran passieren und es kommt zu einer Färbung der nekrotischen Zellen.[91]

Bei der Untersuchung der CD4⁺ und CD8⁺ CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme des Anteils an Ann.V⁻ PI⁻ lebenden Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Applikation von G-CSF (Abbildung 18). So kam es bei den CD4⁺ T-Zellen zu einer Zunahme von 78% auf 93%. Bei den CD8⁺ T-Zellen kam es zu einer Zunahme von 70,9% auf 91,2%. Entsprechend kam es zu einer signifikanten Abnahme des Anteils an Ann.V⁺ PI⁻ früh-apoptotischen Zellen. Der Anteil an Ann.V⁺ PI⁺ spät-apoptotischen und an Ann.V⁻ PI⁺ nekrotischen Zellen zeigte sich sowohl vor als auch nach Applikation von G-CSF vernachlässigbar gering.

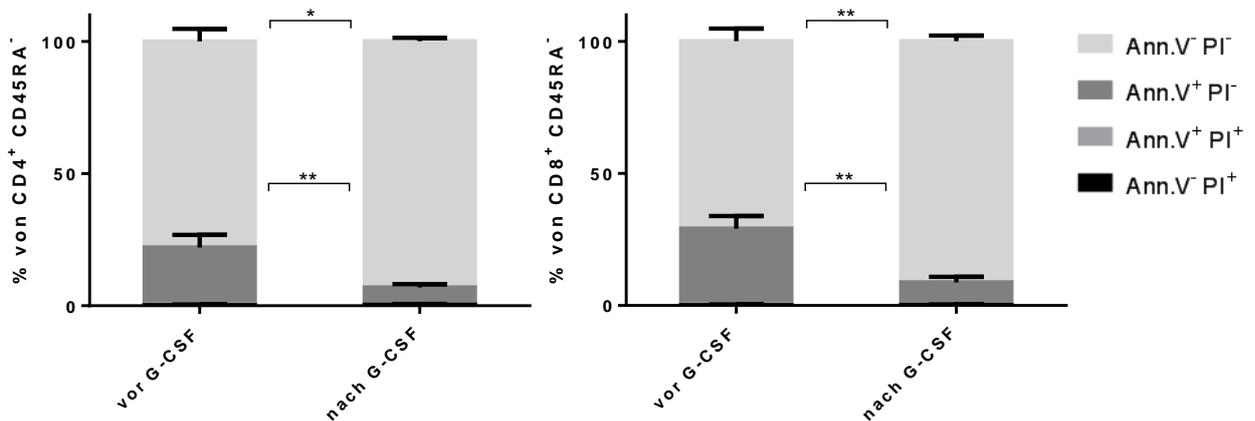


Abbildung 18: Anteil der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Die Abbildung zeigt die Aufteilung der CD4⁺ und CD8⁺ CD45RA⁻ Gedächtniszellen in die vier Populationen der lebenden (Ann.V⁻ PI⁻), früh-apoptotischen (Ann.V⁺ PI⁻), spät-apoptotischen (Ann.V⁺ PI⁺), und nekrotischen (Ann.V⁻ PI⁺) Zellen. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=9, *p≤0,05, **p≤0,01

Im Vergleich zwischen peripherem Blut und Knochenmark zeigte sich ein ähnliches Bild (Abbildung 19). So ist der Anteil an Ann.V- PI- lebenden Zellen im Knochenmark deutlich höher als im peripheren Blut. Signifikanzen wurden hier aufgrund der geringen Anzahl untersuchter Proben nicht erreicht ($p=0,0625$ bei den $CD4^+$ und bei den $CD8^+$ Gedächtniszellen)

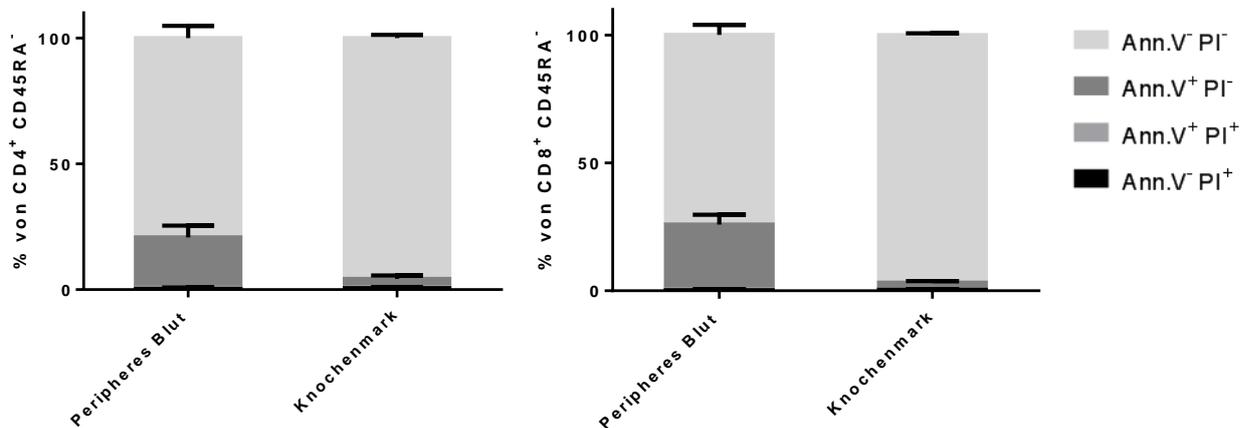


Abbildung 19: Anteil der lebenden, früh-apoptotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen innerhalb der $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellen im peripheren Blut und im Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. Die Abbildung zeigt die Aufteilung der $CD4^+$ und $CD8^+$ $CD45RA^-$ Gedächtniszellen in die vier Populationen der lebenden ($Ann.V^- PI^-$), früh-apoptotischen ($Ann.V^+ PI^-$), spät-apoptotischen ($Ann.V^+ PI^+$), und nekrotischen ($Ann.V^- PI^+$) Zellen im Knochenmark und peripheren Blut. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. $n=4$

3.2.3 Proliferationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses von G-CSF auf das Proliferationsverhalten der Gedächtniszellpopulationen wurde ein Antikörper gegen das Protein Ki67 verwendet. Ki67 befindet sich während der G0 Phase des Zellzyklus im Zellkern und wird während der aktiven Phasen des Zellzyklus auf die Oberfläche der Chromosomen verlagert. Daher eignet es sich zur Bestimmung der Wachstumsfraktion einer Zellpopulation. [92]

In Abbildung 20 ist der Anteil der Ki67-positiven $CD4^+$ und $CD8^+$ $CD45RA^-$ Gedächtnis-T-Zellen dargestellt. Es zeigte sich insgesamt eine geringe Expression von Ki67, die nach G-CSF-Gabe für $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen abnahm, die Unterschiede zeigten jedoch keine Signifikanzen.

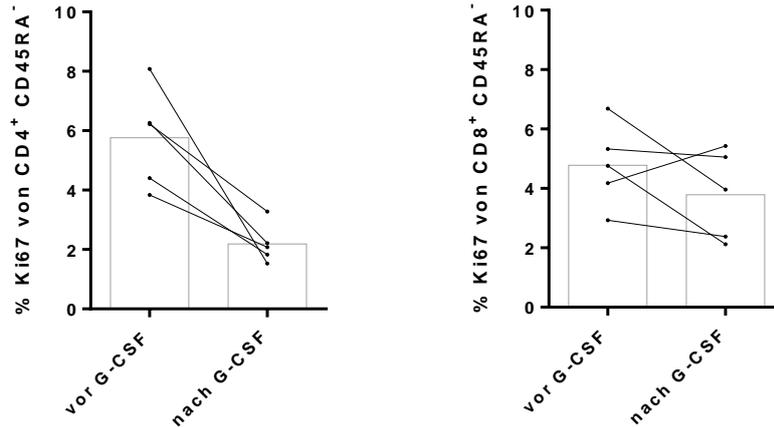


Abbildung 20: Anteil der Ki67-Expression innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=5

Die Expression von HLA-DR (humanes Leukozytenantigen DR) auf CD8⁺ T-Zellen korreliert mit der Proliferation dieser Zellen und kann daher ähnlich wie Ki67 als Aktivierungs- bzw. Proliferationsmarker genutzt werden [93]. Bei der Untersuchung dieses Markers bestätigen sich die Ergebnisse aus der Untersuchungen mit Ki67 (Abbildung 21). So zeigt sich keine erhöhte Aktivierung bzw. Proliferation nach Behandlung mit G-CSF auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen.

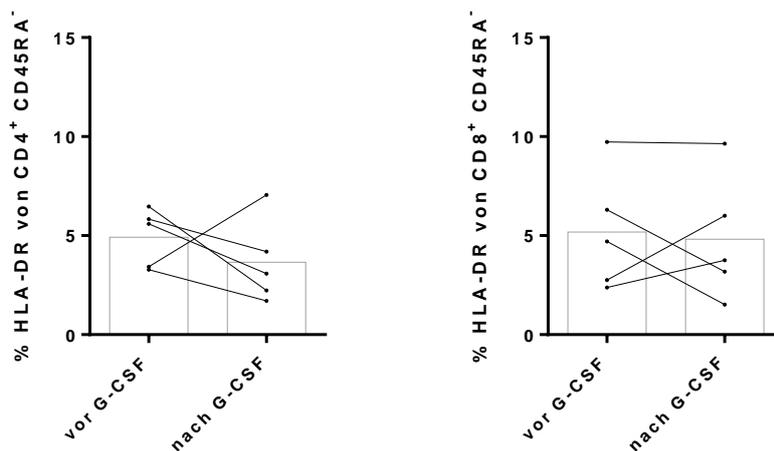


Abbildung 21: Anteil der HLA-DR-Expression innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=5

3.2.4 Gewebemarker und *Homing*-Moleküle auf Gedächtnis-T-Zellen

Gewebemarker auf Gedächtniszellen vor und nach G-CSF

Um zu untersuchen, ob gewebeständige Gedächtniszellen durch G-CSF in das periphere Blut mobilisiert werden, wurde die Expression ausgewählter Gewebemarker und *Homing*-Moleküle auf den Gedächtniszellen im peripheren Blut von Stammzellspendern vor und nach Applikation von G-CSF untersucht. Abbildung 22 zeigt eine Übersicht über die Expression der Marker auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF.

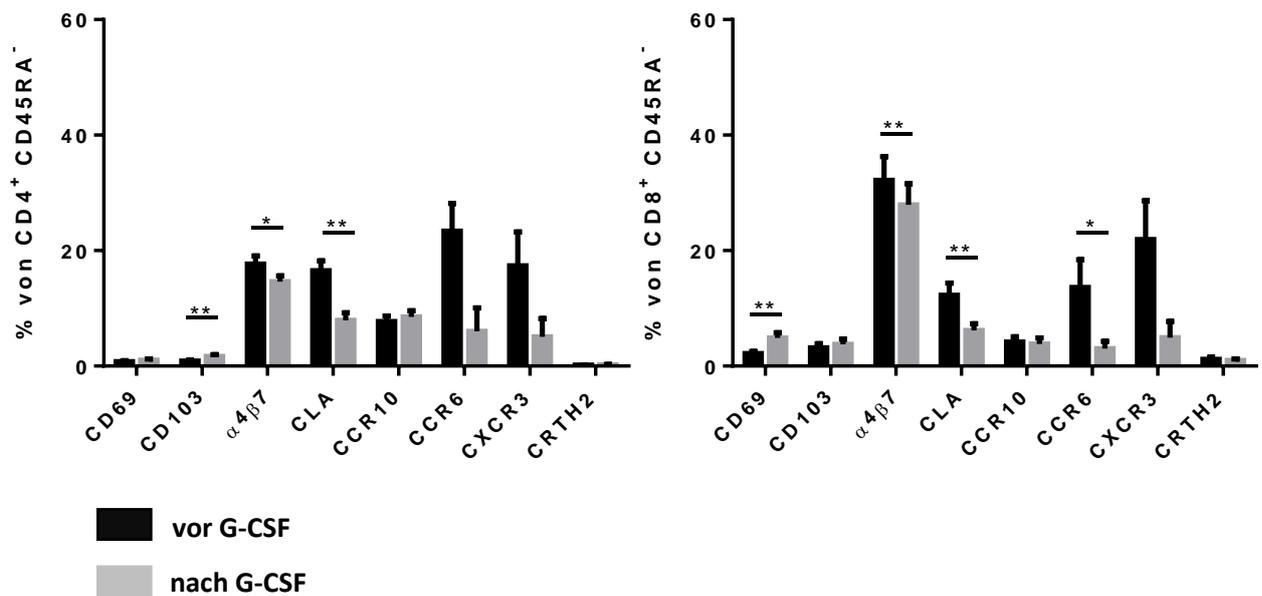


Abbildung 22: Anteil der Gewebemarker-exprimierenden Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Dargestellt ist die Markerexpression von CD69 (n=15), CD103 (n=11), α4β7-Integrin (n=15), CLA (n=14), CCR10 (n=7), CCR6 (n=6), CXCR3 (n=6), CRTH2 (n=10) auf CD4⁺CD45RA⁺ (links) und CD8⁺CD45RA⁺ (rechts) Gedächtnis T-Zellen vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) G-CSF Behandlung. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet und sind gekennzeichnet *p<0,05; **p<0,01.

Die Untersuchung der Gewebemarker vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF zeigte eine signifikante Abnahme der Marker α4β7-Integrin (*Homing*-Molekül für den Darm) und CLA (*Homing*-Molekül für die Haut) sowohl auf den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Die Expression von α4β7 fiel nach G-CSF von 17,7% auf 14,6% bei den CD4⁺ und von 32,2% auf 27,9% bei den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Die Expression von CLA sank bei den CD4⁺ T-Zellen von 16,6% auf 7,9% und bei den CD8⁺ T-Zellen von 12,3% auf 6,2%. Eine deutliche Abnahme der Expression fand sich zudem bei den Markern CCR6 und CXCR3. Eine leichte Zunahme in der Expression ließ sich bei den Markern CD69 und CD103 verzeichnen. So stieg die CD103-Expression signifikant von 0,9% auf 1,7% bei den CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen, bei den

CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen nahm die CD69-Expression signifikant von 2,2% auf 4,9% zu. Die Expression von CCR10 und CRTH2 zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Gewebemarker auf Gedächtniszellen im Knochenmark und peripherem Blut

Abbildung 23 zeigt die Expression der Gewebemarker und *Homing*-Moleküle vergleichend im peripheren Blut (PB) und im Knochenmark (KM). Hier zeigte sich eine deutlich höhere Expression von CD69 im Knochenmark als im peripheren Blut sowohl bei den CD4⁺ (1% im PB vs. 23,6% im KM) als auch bei den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen (2,9% im PB vs. 52,4% im KM). Die Expression von CD103 war im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut bei den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen signifikant erhöht (3,2% im KM vs. 1,5% im PB). Im Gegensatz zu CD69 und CD103 ließ sich bei den Markern $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CLA, CCR10, CCR6 und CXCR3 eine geringere Expression im Knochenmark als im peripheren Blut beobachten. Signifikante Unterschiede zeigte dabei die Expression von CLA. Diese betrug im Mittel 16,5 bzw. 11,6% auf den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut und nur 4,9% (CD4⁺) bzw. 1,7% (CD8⁺) im Knochenmark. Die Expression von CRTH2 auf den Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut und im Knochenmark war auch in der Kohorte der Patienten, bei denen eine Hüft-Operation durchgeführt wurde, gering und zeigte zwischen Gedächtnis-T-Zellen in Blut und Knochenmark keine signifikanten Unterschiede.

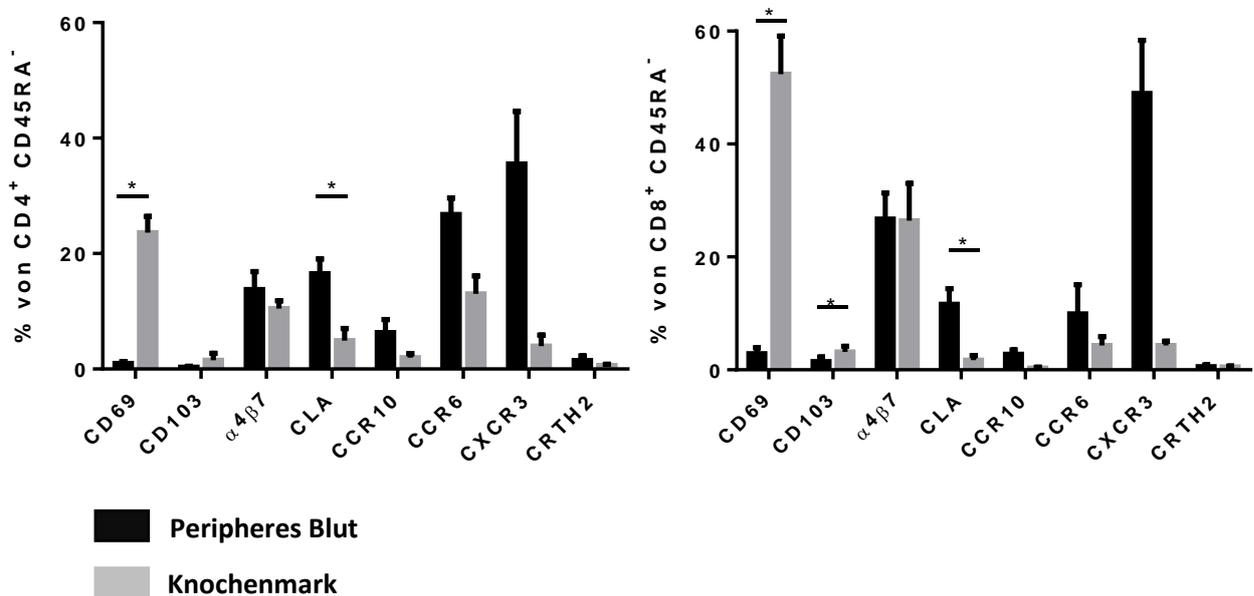


Abbildung 23: Anteil der Gewebemarker-exprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen im peripherem Blut und Knochenmark bei Patienten mit Hüft-TEP-Operation. PBMC aus dem Blut und BMMC aus dem Knochenmark von Patienten, bei denen eine Hüftkopf-TEP implantiert wurde, wurden isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Markerexpression von CD69 (n=7), CD103 (n=7), $\alpha_4\beta_7$ -Integrin (n=5), CLA (n=7), CCR10 (n=5), CCR6 (n=5), CXCR3 (n=5) und CRTH2 (n=7) auf den CD4⁺ CD45RA⁻ (links) und CD8⁺ CD45RA⁻ (rechts) Gedächtnis-T-Zellen aus Blut (schwarze Balken) und Knochenmark (graue Balken). Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. *p<0.05

Vergleicht man die Verteilung der Expression der Marker vor und nach G-CSF sowie im peripheren Blut und im Knochenmark miteinander, so zeigt sich, dass die Expression der Marker im peripheren Blut nach Behandlung mit G-CSF der Expression der Marker im Knochenmark ähnlicher wird. Eine Ausnahme bildet CD69.

Absolute Gedächtniszellzahlen und ihre Markerexpression im peripheren Blut

Aus den zuvor dargestellten absoluten Zellzahlen der Gedächtniszellen (Abbildung 11) lassen sich über die prozentuale Verteilung der Marker-spezifischen Populationen die entsprechenden absoluten Zellzahlen der Gedächtniszell-Subpopulationen errechnen (Abbildung 24). Sowohl bei den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen stieg die Anzahl der CD69⁺, CD103⁺, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺, CCR10⁺ und CRTH2⁺ T-Zellen signifikant an. Die Anzahl an CLA⁺ T-Zellen veränderte sich nicht signifikant nach Behandlung mit G-CSF. Die Anzahl der CCR6⁺ und CXCR3⁺ Gedächtnis-T-Zellen zeigten keine signifikanten Unterschiede.

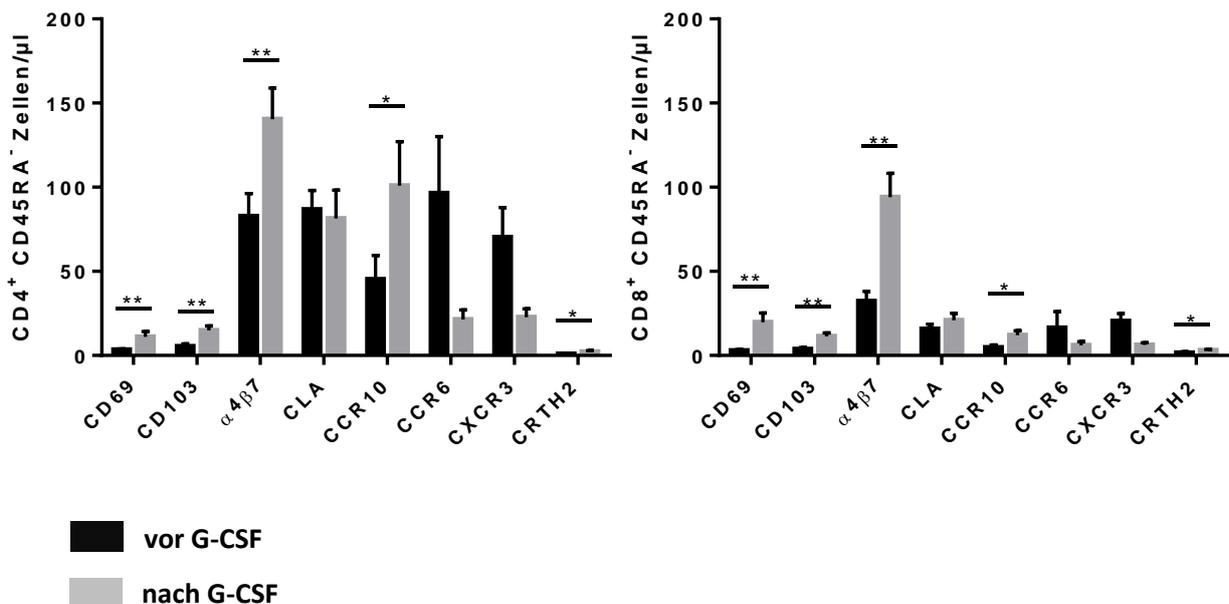


Abbildung 24: **Absolute Zellzahl der Gewebemarker-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF.** Bei gesunden Stammzellspendern wurden PBMC vor und nach Behandlung mit G-CSF isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Die absoluten Zahlen der Lymphozyten wurden mit Hilfe eines Differentialblutbildes ermittelt und für die Berechnung der absoluten Zahlen der Subpopulationen zugrunde gelegt. Die Berechnung erfolgte über die prozentualen Anteile der jeweiligen Subpopulationen an den Lymphozyten. Dargestellt ist die Markerexpression von CD69 (n=15), CD103 (n=11), alpha4beta7 (n=15), CLA (n=14), CCR10 (n=7), CCR6 (n=6), CXCR3 (n=6), CRTH2 (n=10) auf CD4⁺ (links) und CD8⁺ (rechts) CD45RA⁻ Gedächtnis T-Zellen vor (schwarze Balken) und nach (graue Balken) G-CSF Behandlung. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. *p<0.05; **p<0.01

3.2.5 α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen

α -Defensin 1-3 (DEFA1-3) wurde von der Arbeitsgruppe als potentieller Marker für Gedächtnis-T-Zellen aus dem Knochenmark identifiziert (Publikation eingereicht). In vergleichenden intrazellulären Färbungen zwischen Knochenmark und peripherem Blut konnte eine signifikant höhere DEFA1-3-Expression im Knochenmark gezeigt werden. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in dieser Arbeit vergleichende Analysen zur α -Defensin-Expression vor und nach Behandlung mit G-CSF durchgeführt. Da sich im Gegensatz zu den Färbungen im Knochenmark im peripheren Blut keine deutliche Abgrenzung zwischen α -Defensin-positiven und -negativen Populationen vornehmen ließ, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewertet. Die MFI ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Zelle und zeigt damit die Rezeptordichte an. Dabei zeigte sich sowohl bei den CD4⁺ als auch bei den CD8⁺ Gedächtniszellen ein Anstieg der DEFA1-3-Expression nach Behandlung mit G-CSF (Abbildung 25). Bei den CD4⁺ Zellen zeigte sich ein signifikanter MFI-Anstieg von 2025 vor G-CSF auf 4512 nach G-CSF. Bei den CD8⁺ Gedächtniszellen zeigte sich ein Anstieg von 1591 auf 4454.

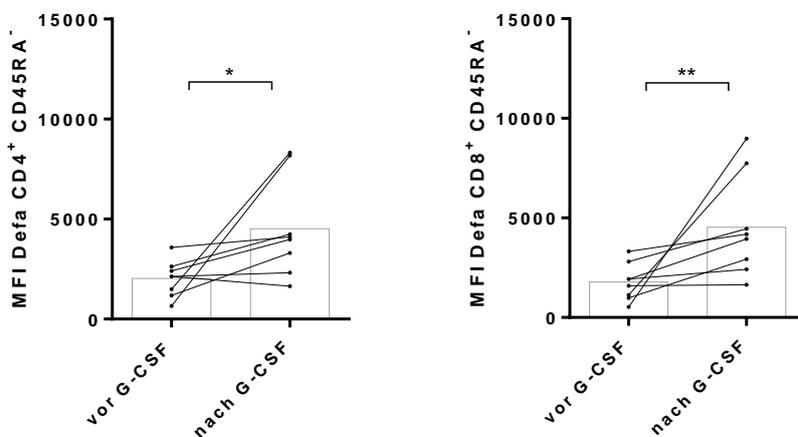


Abbildung 25: Defa-Expression in den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach G-CSF Behandlung. Dargestellt ist die DEFA1-3-Expression auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF. Es wurden gepaarte Proben von den jeweiligen Stammzellspendern vor und nach G-CSF untersucht. Die entsprechenden Werte sind mit Linien verbunden. Die Balken kennzeichnen den Mittelwert. Statistische Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon-Test berechnet. n=8, *p<0.05; **p<0.01

In den vergleichenden Analysen zwischen peripherem Blut und Knochenmark hatten sich in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe signifikante Unterschiede in der Konzentration der DEFA1 und DEFA3 cDNA in Mikrovesikeln gezeigt. Daraus ergab sich die Hypothese, dass α -Defensine von Gedächtniszellen im Knochenmark-Milieu aufgenommen werden. Aufbauend auf diesen

Ergebnissen und den Unterschieden, die sich in den intrazellulären Färbungen gezeigt hatten, untersuchten wir die Konzentration der DEFA1 und DEFA3 cDNA in Mikrovesikeln vor und nach G-CSF. Mikrovesikel wurden dazu wie oben angegeben vor und nach G-CSF aus dem Serum isoliert und die DEFA1 und DEFA3 cDNA Expression gemessen. Zur Erstellung von Standardkurven für die Quantifizierung der cDNA-Werte wurde eine Verdünnungsreihe mit cDNA aus erylysiertem und CD19⁺-depletiertem Vollblut verwendet. Es zeigte sich dabei auch nach Verwendung dieser Standardkurven ein Anstieg der DEFA1 und DEFA3 cDNA-Konzentrationen nach G-CSF und damit eine hohe Ratio „vor G-CSF“ zu „nach G-CSF“ (Abbildung 26 und 27).

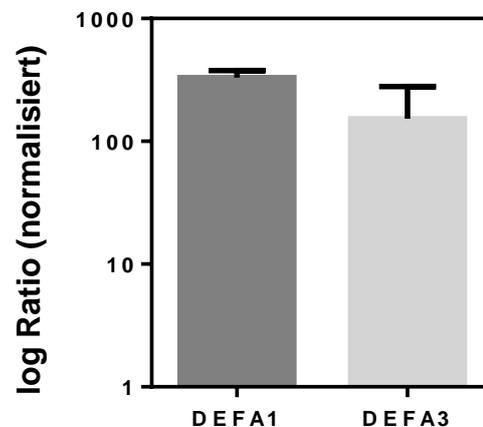


Abbildung 26: Ratio der DEFA1 und DEFA3 cDNA Konzentration vor G-CSF/nach G-CSF. Der dunkelgraue Balken zeigt die Ration vor G-CSF/nach G-CSF von DEFA1, der hellgraue die von DEFA3. Die Ratio ist logarithmisch dargestellt und wurde mit Hilfe der Kurve aus Abbildung 27 normalisiert. Striche und Balken kennzeichnen die mittlere logarithmische Ratio +/- SEM.

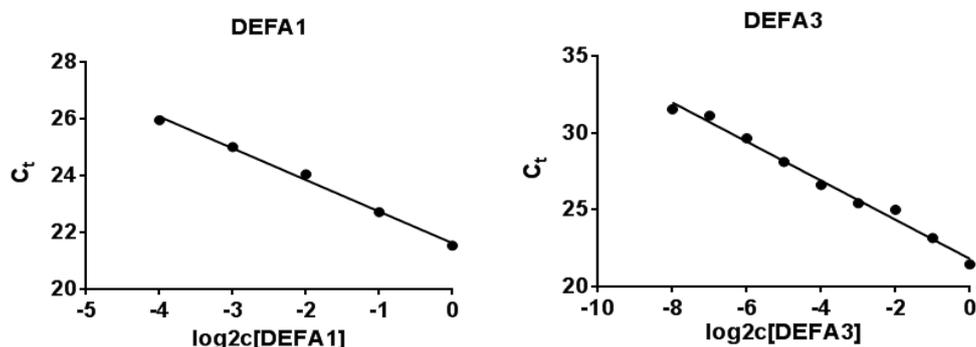


Abbildung 27: Standardkurven für die Normalisierung der cDNA Konzentration. Dargestellt ist der C_t-Wert gegen die binäre logarithmische Konzentration von DEFA1 bzw. DEFA3. Der Zyklus, in dem sich das spezifische Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundsignal hervorhebt, wird als der Zyklus-Schwellenwert (engl. cycle threshold, C_t) bezeichnet. Je niedriger der C_t-Wert, desto höher ist das Expressionsniveau des Zielgens in der Probe. [94]

3.2.6 G-CSF-Rezeptor-Expression auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten

Es stellt sich die Frage, ob die beobachteten Veränderungen durch G-CSF durch einen direkten Effekt des Wirkstoffes auf die Gedächtnis-T-Zellen zustande kommen kann. Wie in der Einleitung angesprochen, gibt es unterschiedliche Meinungen in der Literatur. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der G-CSF-Rezeptor CD114 auf den Gedächtnis-T-Zellen exprimiert ist und damit ein direkter Effekt möglich ist. Es wurde dazu eryliertes peripheres Blut eines G-CSF mobilisierten Stammzellspenders untersucht. Als Positivkontrolle wurde die Expression von CD114 auf den Granulozyten bzw. Monozyten genutzt. Dabei zeigte sich eine Expression von CD114 auf den Granulozyten und auf den Monozyten, jedoch nicht auf den Lymphozyten im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (Abbildung 28 und 29).

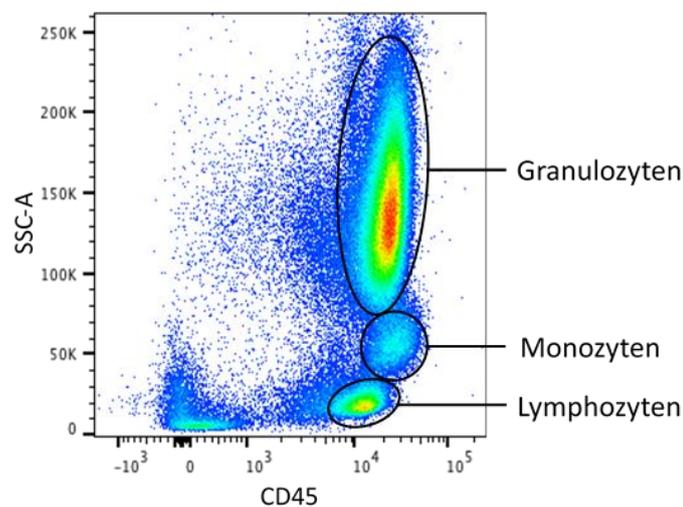


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Identifizierung von Granulozyten-, Monozyten- und Lymphozyten bei einem Stammzellspeder nach Behandlung mit G-CSF.

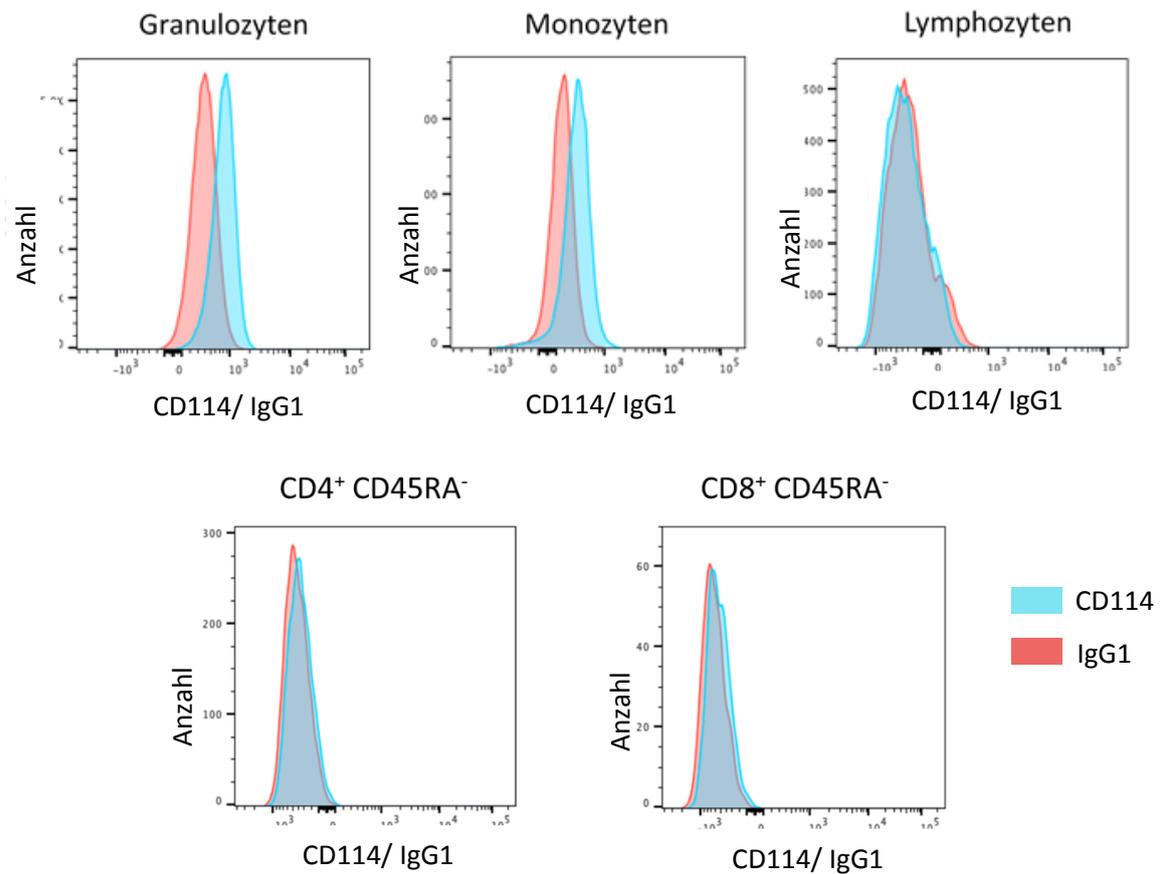


Abbildung 29: CD114-Expression (G-CSF Rezeptor) auf den Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten sowie CD4⁺ und CD8⁺ CD45RA⁻ Gedächtniszellen. Die blaue Kurve zeigt die Expression von CD114, die rote Kurve zeigt die entsprechende Isotypenkontrolle.

3.3 Ergebnisse Stammzellempfänger

3.3.1 Stammzellempfänger – Klinischer Verlauf

Im Folgenden soll der klinische Verlauf der untersuchten Stammzellempfänger zusammengefasst werden (Tabelle 9). Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der retrospektiven Auswertung von Krankenakten.

Zwei Patientinnen (Patientin Nr. 5 und Patientin Nr. 8) verstarben im Verlauf nach Transplantation. Sie litten unter einem Myelom IgG Lambda bzw. einem refraktärem DLBCL. Patientin Nr. 5 verstarb an Tag +32 aufgrund eines Multiorganversagens bei septischem Schock. Es bestand eine Aspergillen Pneumonie mit ausgeprägten Embolien cerebral, enteral, renal und in der Milz. Zudem bestand eine schwere Mukositis, Vorhofflimmern, eine hepatische Enzephalopathie und ein akutes Nierenversagen. Patientin Nr. 8 erlitt eine Progression des DLBCLs und verstarb an Tag +22 nach Transplantation.

GvHD

Bei den Patienten 2, 6 und 10 entwickelte sich im Verlauf nach Transplantation eine akute GvHD der Haut. Diese trat bei Patientin 2 an Tag +27 nach allo-HSZT auf und bestand in einem auf das Dekolleté begrenzten makulo-papulösen Exanthem. Zu den Zeitpunkten +15 und +30 lag die CLA Expression bei den CD4⁺ Zellen zwischen 5-9% und bei den CD8⁺ Zellen <1%. An Tag +32 zeigte sich der Befund nach Behandlung mit Methylprednisolon-haltiger Creme rückläufig. Bei Patientin Nr. 6 trat eine akute GvHD Grad 1 der Haut an Tag +22 in Form eines feinfleckigen Exanthems am Dekolleté und Bauch auf. Die Untersuchungen an Tag +15 und +30 zeigten erneut eine CLA-Expression in den CD4⁺ Gedächtniszellen, jedoch eine nur sehr geringe Expression in den CD8⁺ Zellen. Es fällt auf, dass die CLA Expression bei den Patienten, die eine aGvHD der Haut entwickelt haben nicht wie in anderen Studien beschrieben, erhöht war, sondern, dass insbesondere bei den CD8⁺ Gedächtniszellen eine auffallend niedrige CLA-Expression von <1% zu finden war. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass die CLA⁺ Zellen in die Haut migrieren, dort eine GvHD auslösen und daher im peripheren Blut ein geringerer Anteil an CLA-exprimierenden Zellen nachweisbar ist.

Eine GvHD des Darms trat bei keiner der untersuchten Patienten auf. Obwohl die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin bei einigen Patienten hoch war, traten keine Anzeichen einer akuten GvHD des Darms auf.

Infektionen

Bei Patient Nr. 3 entwickelte sich an Tag +17 eine atypische Pneumonie, Patientin Nr. 4 entwickelte an Tag +4 Fieber bei V.a. Soor Ösophagitis. Bei Patientin Nr. 7 trat an Tag +26 Fieber auf, Patient Nr. 10 entwickelte an Tag +17 Fieber. Ein Erregernachweis gelang bei keinem der Patienten. Patientin Nr. 5 starb im Verlauf nach Transplantation unter anderem an einer Aspergillen Pneumonie. Bei Patientin Nr. 8 konnte an Tag +9 bei Fieber CMV in der PCR nachgewiesen werden. Die Patientin verstarb im Verlauf am Progress der Krankheit.

Rezidive

Bei Patient Nr. 3 entwickelte sich nach Ende des Beobachtungszeitraums dieser Studie nach ca. 4-5 Monaten ein Transplantationsversagen mit Abfall des Spender-Chimärismus und nachfolgender Infusion von Spenderlymphozyten sowie erneuter allogener Stammzelltransplantation von einem Fremdspender. Bei diesem Patienten wurden initial aufgrund der schwachen Mobilisierung beim

Spender nur $0,9 \times 10^6$ CD34⁺ Zellen/ kgKG des Empfängers übertragen. Es wird angestrebt 5×10^6 CD34⁺ Zellen/ kgKG des Empfängers zu transplantieren.

In die Auswertung der T-Zell Verläufe eingegangen sind die Daten der Patienten 2,3,4,6,7 und 9. Nicht ausgewertet werden konnten die experimentellen Ergebnisse der Patientinnen Nr. 5 und Nr. 8. Bei beiden Patientinnen war die Anzahl der Lymphozyten zu den angestrebten Zeitpunkten nicht ausreichend, um auswertbare Ergebnisse zu erhalten. Beide Patientinnen starben im Verlauf nach der Transplantation. Bei Patientin Nr. 1 stellte sich an den untersuchten Zeitpunkten von Tag +7 bis +29 keine abgrenzbare CD3⁺ T-Zell-Population dar. Der Anteil der CD3⁺ Zellen an den Lymphozyten betrug bis Tag +30 <1%. Erst zu den Zeitpunkten Tag +71 und Tag +160 zeigte sich ein deutlich höherer Anteil an T-Zell-Populationen. Bei dieser Patientin fiel interessanterweise auf, dass der Anteil an CD19⁺ B-Zellen insbesondere zu den frühen Zeitpunkten hoch war. Auffällig hoch war auch der Anteil an CD19⁺ Zellen bei der entsprechenden Spenderin nach G-CSF. Aufgrund des geringen Anteils an T-Zellen war eine aussagekräftige Auswertung der T-Zell Subpopulationen zu den frühen Zeitpunkten nach Transplantation nicht möglich. An Tag +167 nach Transplantation wurden steigende Leberwerte festgestellt und der Verdacht auf eine Leber-GvHD gestellt. Bei Patient Nr. 10 zeigte sich ein im Vergleich zu den anderen Patienten geringer Anteil an CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen im Verlauf nach Transplantation. Eine aussagekräftige Auswertung der Markereexpression auf den Gedächtniszellen ist aufgrund der geringen Zellzahl nicht möglich gewesen.

Tabelle 9: Zusammenfassung der nach Transplantation aufgetretenen Komplikationen bei den Stammzellempfängern

Patient	Infekte	GvHD	Progress/Rezidiv
1	Tag +150: Hordeolum am rechten und linken Auge	Tag +167: Anstieg der Leberwerte; Verdacht auf Leber GvHD	-
2	Tag +160: Pneumonie mit Parainfluenza-Nachweis	Tag +27: Beginnendes Exanthem, sehr umschriebene makulopapulöse GvHD der Haut auf das Dekolleté beschränkt Tag +32: Hautbefund regredient unter Adavantancreme (Methylprednisolon)	-
3	Tag +17: Fieber in der Neutropenie, atypische Pneumonie ohne Erregernachweis	-	Ab Tag +100: Chimärismusabfall, 2-malige Donorlymphozyteninfusion sowie im Verlauf Retransplantation nach Transplantationsversagen

4	Tag +4: Fieber bei Verdacht auf Soor-Ösophagitis, kein Erregernachweis	-	-
5	Tag +32: Exitus letalis; Aspergillen-Pneumonie mit septischem Schock, Multiorganversagen und ausgeprägten septischen Embolien	-	-
6	-	Tag +22: Feinfleckiges Exanthem am Dekolleté und Bauch. Eine Stanzbiopsie der Haut bestätigte den Verdacht auf eine GvHD der Haut Grad 1. Unter lokaler steroidhaltiger Therapie war der Hautbefund regredient.	-
7	Tag +26: Fieber ohne Erregernachweis	-	-
8	Tag +9: Nachweis von CMV in der PCR und Einleitung der antiviralen Therapie mit Ganciclovir Tag +15: Fieber ohne Erregernachweis, Eskalation der antibiotischen Therapie mit Meronem	-	Tag +22: Exitus letalis; Progress der Grunderkrankung
9	-	-	-
10	Tag +17: Fieber ohne Erregernachweis. Therapie mit Piperacillin/Tazobactam.	GvHD der Haut	-

3.3.2 Stammzellempfänger – Experimentelle Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der gepaarten Proben von Stammzellspendern und Stammzellempfängern dargestellt. Im linken Teil der Grafiken sind jeweils die Ergebnisse der Spender (hellblaue Balken) vor Mobilisierung (v.M.) und nach der Mobilisierung mit G-CSF (n.M.) dargestellt. Im rechten Teil finden sich die Ergebnisse der dazugehörigen Stammzellempfänger (dunkelblaue Balken) im Verlauf nach der Transplantation. Bei den Ergebnissen der Stammzellspender sind im Gegensatz zu den Abbildungen in Abschnitt 3.2.2 nur die Spender dargestellt, deren entsprechende Empfänger untersucht werden konnten. Es wurden verschiedene Zeitpunkte nach Transplantation untersucht. Es ist jeweils der mittlere Zeitpunkt der Probensammlung angegeben. Die tatsächliche Probensammlung erfolgte an den Tagen 7 +/-1, 15 +/-1, 30 +/-5, 60 +/- 20 und 110 +/-10 nach der Transplantation.

3.3.2.1 T-Zell-Populationen und Subpopulationen

T-Zell-Populationen

Zunächst erfolgte analog zu der Betrachtung der Stammzellspender die Verlaufsanalyse der CD3⁺ sowie der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellfrequenzen. Zudem betrachteten wir die Verteilung der Subpopulationen innerhalb der CD4⁺ T-Helfer und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. Dabei wurde zum einen der Verlauf der gesamten CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen betrachtet und zum anderen die Aufteilung in die vier Subpopulationen der T_{CM}, T_{naïven}, T_{EMRA} und T_{EM} Zellen vorgenommen.

Es zeigte sich, dass der Anteil der CD3⁺ T-Zellen an den Lymphozyten beim Stammzellspender einhergehend mit den oben dargestellten Ergebnissen nach Behandlung mit G-CSF abnahm (Abbildung 30). Im Stammzellempfänger zeigte sich an Tag +7 zunächst ein ähnlicher Anteil an CD3⁺ T-Zellen (66,2%) wie beim Spender nach Mobilisation (63,7%). Bis Tag +30 fiel der Anteil ab (35,8%) und stieg dann an den Tagen +60 (45,4%) und +110 (56,5%) wieder an. Die CD3⁺ Zellzahl war nach der Spende im Transplantatempfänger erwartungsgemäß gering (58 Zellen/μl) und stieg über 155 Zellen/μl an Tag 30 auf 959 Zellen/μl an Tag +60. An den Tagen +60 und +110 nach Transplantation schwankten die Werte interindividuell sehr stark. Die CD3⁺ Zellzahl blieb auch an Tag +110 nach Transplantation im Mittel deutlich unter der Zahl beim gesunden Spender vor G-CSF.

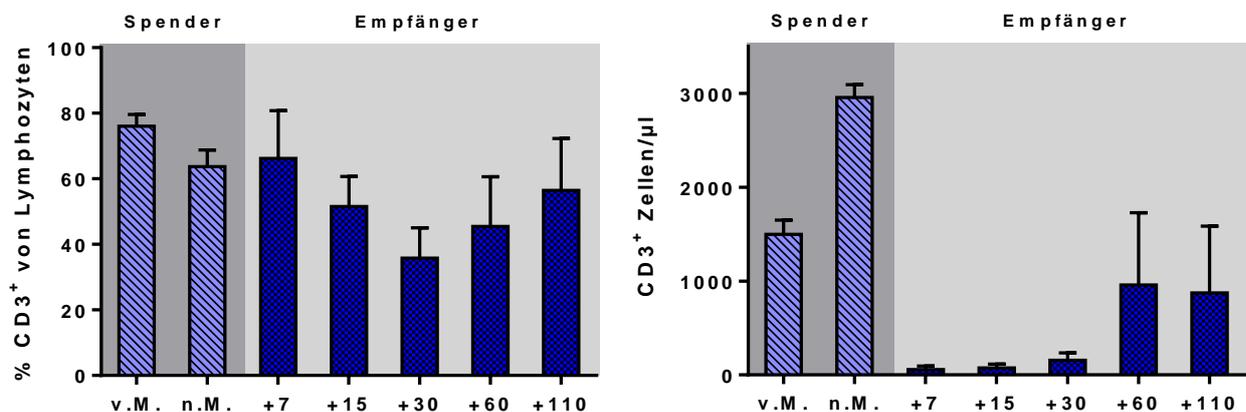


Abbildung 30: Prozentualer und absoluter Verlauf der CD3⁺ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert ± SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

Wird der Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ T-Zellen betrachtet, so zeigt sich einhergehend mit den oben dargestellten Ergebnissen ein Abfall des Anteils an CD4⁺ Zellen

zugunsten eines Anstiegs der CD8⁺ Zellen bei den Stammzellspendern. Bei den Stammzellempfängern zeigten sich ein deutlich erhöhter Anteil an CD8⁺ T-Zellen und ein deutlich verminderter Anteil an CD4⁺ T-Zellen im gesamten Verlauf nach Transplantation bis Tag 110 (Abbildung 31). Am stärksten ausgeprägt war die Differenz zwischen dem Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an Tag +60 mit 23,5% CD4⁺ T-Zellen und 65,8% CD8⁺ T-Zellen.

Die absoluten Zellzahlen stiegen im Verlauf nach Transplantation an (Abbildung 32). Dabei blieb die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen auch bis Tag +110 mit 130 Zellen/μl auf einem sehr niedrigen Niveau. Die CD8⁺ Zellen stiegen an Tag +60 auf 752/μl und fielen dann leicht auf 615 Zellen/μl an Tag +110.

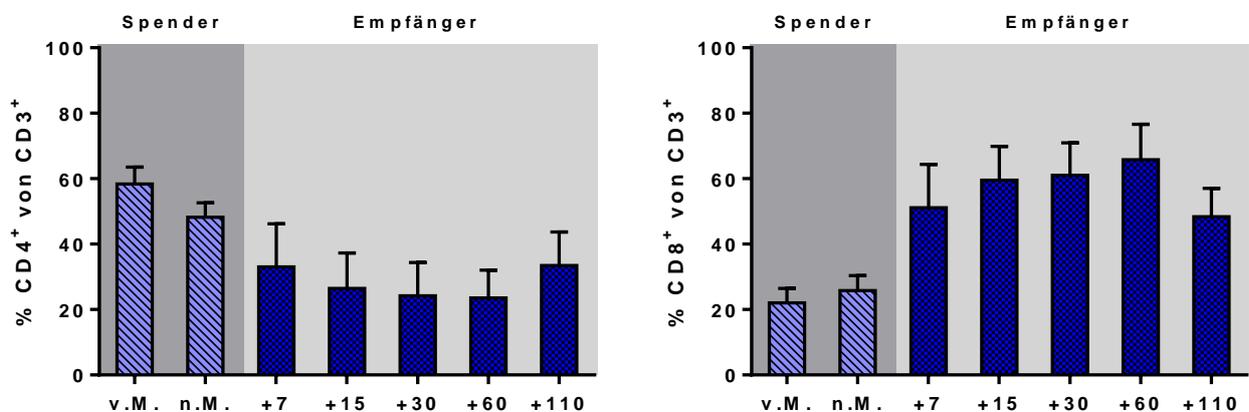


Abbildung 31: Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ Zellen innerhalb der CD3⁺ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

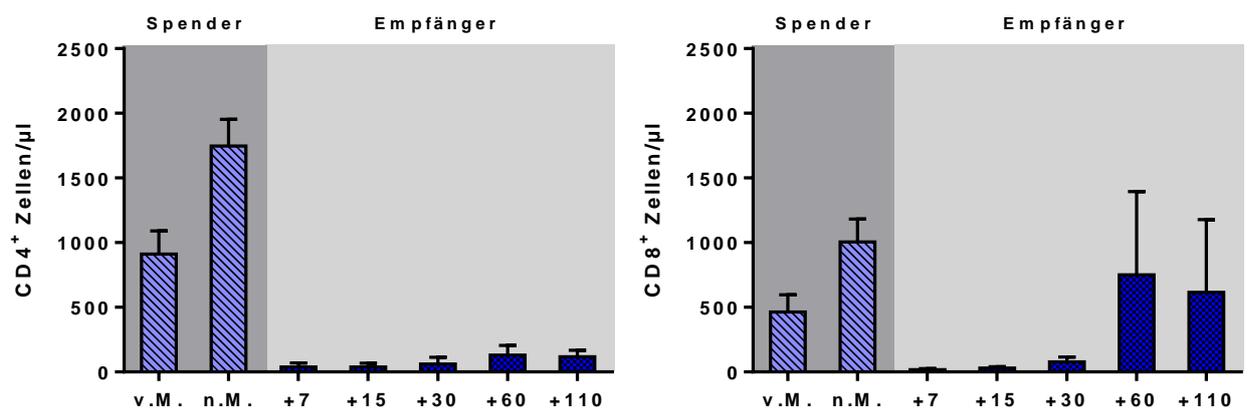


Abbildung 32: Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

Gedächtniszellpopulationen

Des Weiteren wurde der Anteil der CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt (Abbildung 33). Dabei zeigten sich bei den Spendern, wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben, keine deutlichen Unterschiede vor und nach Behandlung mit G-CSF. Es zeigte sich jedoch bei den CD4⁺ T-Zellen ein deutlich erhöhter Anteil an CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen im Verlauf nach der Transplantation im Vergleich zu dem Anteil der Gedächtnis-T-Zellen beim Spender vor und nach G-CSF Behandlung. Der Anteil an CD45RA⁻ Zellen nahm zudem bis Tag +110 nach Transplantation zu. Bei den CD8⁺ T-Zellen hingegen konnten keine deutlichen Unterschiede im Verlauf nach der Transplantation im Vergleich zum Stammzellspender gezeigt werden.

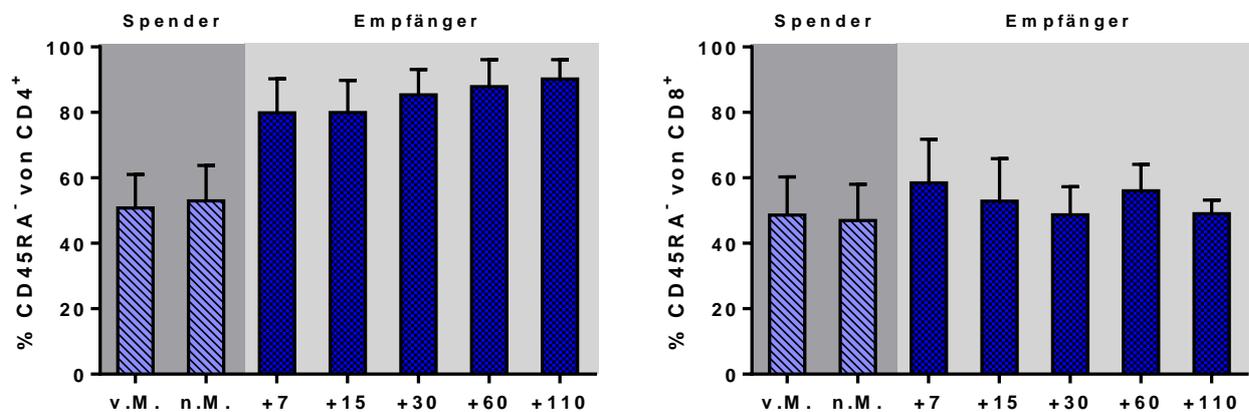


Abbildung 33: Anteil der CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

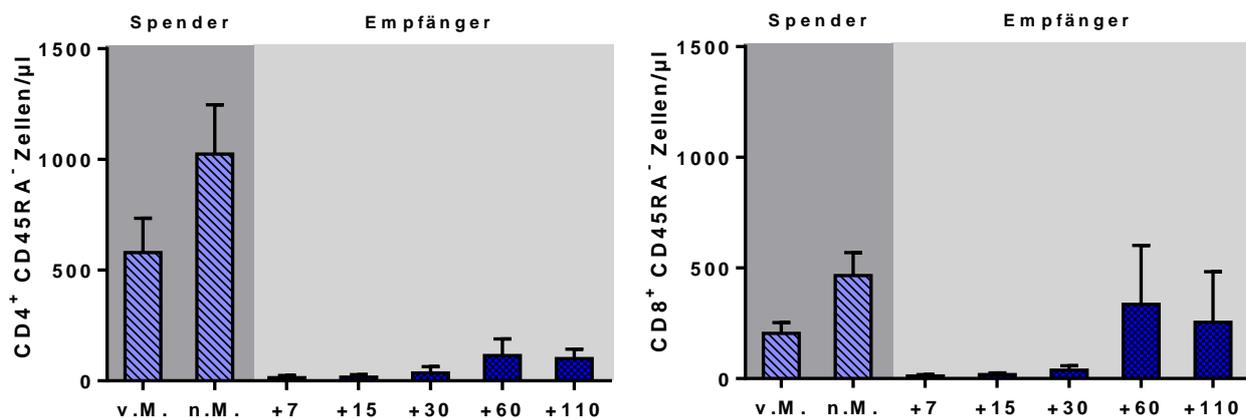


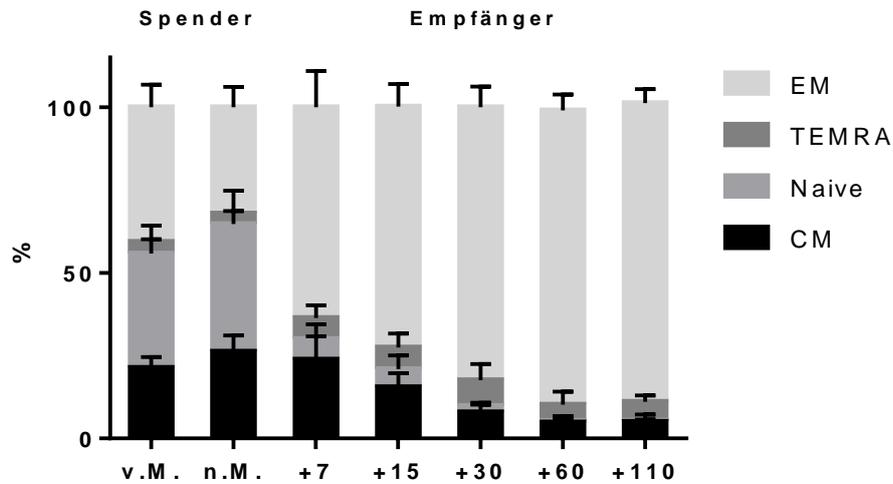
Abbildung 34: Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

Die Betrachtung der einzelnen Subpopulationen im Stammzellempfänger im Verlauf nach der Transplantation zeigte bei den CD4⁺ Zellen einen deutlichen Trend. Es werden an dieser Stelle die Patienten, welche ATG erhielten zusammengefasst und die Patientin, welche kein ATG erhielt, gesondert betrachtet. Wie in Abbildung 35 dargestellt, war der Anteil der T_{EM} Zellen bei der Patientengruppe mit ATG bereits an Tag +7 nach Transplantation deutlich höher als der Mittelwert der Stammzellspender nach Behandlung mit G-CSF (32,1% beim Spender nach G-CSF vs. 63,6% an Tag +7 beim Empfänger nach Transplantation). Der Anteil der T_{EM} Zellen an den CD4⁺ T-Zellen stieg beim Stammzellempfänger im Verlauf bis Tag +110 weiter auf 89%. Der Anteil der anderen Populationen T_{CM}, T_{naive} und T_{EMRA} nahm dementsprechend kontinuierlich ab. Insbesondere der Anteil der naiven CD4⁺ T-Zellen, welcher beim Stammzellspender nach G-CSF noch 38,5% von den CD4⁺ Zellen ausmachte, betrug beim Stammzellempfänger an Tag +7 nur 6,3% und nahm im Verlauf bis 0,5% ab. Der Anteil der T_{CM} Zellen war an Tag +7 (23,8%) ähnlich im Vergleich zum Stammzellspender nach G-CSF (26,2%) und fiel im Verlauf auf 5% an Tag +110 nach Transplantation. Der Anteil an T_{EMRA} Zellen ändert sich im Verlauf nicht wesentlich. Interessanterweise zeigte sich bei der Patientin, welche kein ATG erhielt (Patient Nr. 4, siehe Tabelle 9), ein anderer Verlauf. So stieg zwar auch hier der Anteil der T_{EM} im Verlauf an und es kam zu einer Abnahme der anderen Populationen, jedoch ist bei dieser Patientin auch an Tag +110 noch ein Anteil von 30,6% naive Zellen und ein Anteil von 18,4% T_{CM} Zellen zu finden (Daten nicht als Grafik dargestellt). Zusätzlich zu dem Unterschied im Konditionierungsregime waren in

diesem Fall sowohl das Alter der Patientin selbst (27 Jahre) als auch das Alter des Spenders (29 Jahre) geringer als bei den anderen Personen.

Bei den CD8⁺ Zellen nahm der Anteil der naiven und T_{CM} Zellen ebenfalls ab. Im Vergleich zu den CD4⁺ Zellen war an Tag +110 jedoch ein höherer Anteil an T_{EMRA}-Zellen und damit ein niedrigerer Anteil an T_{EM} Zellen zu verzeichnen. Bei den T_{EMRA}-Zellen zeigte sich ein Anstieg von 21,2% an Tag +7 auf 48,1% an Tag +110 nach Transplantation. Der Anteil an T_{EM} betrug an Tag +110 47,1%. Der Anteil an T_{naiven} Zellen betrug an Tag +110 nach Transplantation lediglich 4,3%. Auch hier zeigt sich bei Patientin Nr. 4 ein deutlich höherer Anteil von 28,7% T_{naiven} Zellen an Tag +110 nach Transplantation.

Subpopulationen CD4⁺



Subpopulationen CD8⁺

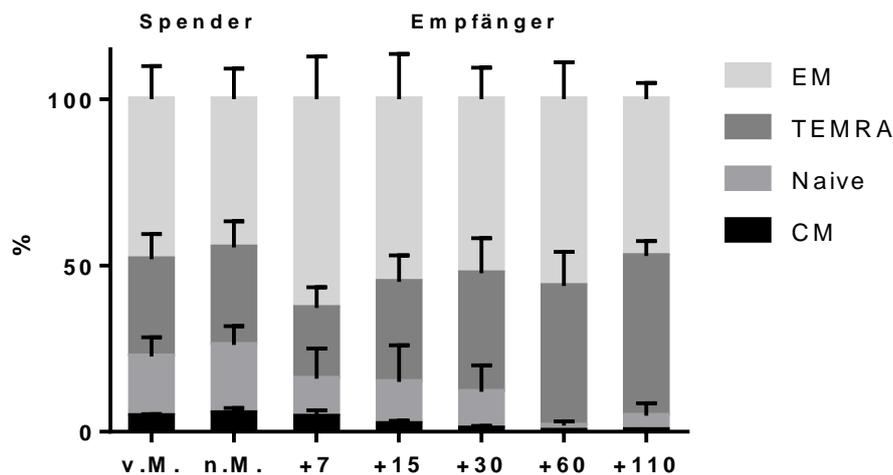


Abbildung 35: Anteil der Subpopulationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF sowie bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Dargestellt sind die Spender/Empfänger-Paare bei denen die Patienten kein ATG erhielten. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sowie der entsprechenden Stammzellempfänger sind als Balken dargestellt. Die Grautöne kennzeichnen den Anteil der Subpopulationen T_{EM}, T_{EMRA}, T_{naive} und T_{CM}. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=5), n.M. (n=5), Tag +7 (n=5), Tag +15 (n=5), Tag +30 (n=5), Tag +60 (n=4), Tag +110 (n=4).

T-Gedächtnis-Stammzellen

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass sich ein Teil der naiven Zellen durch stammzellähnliche Charakteristika auszeichnet. Diese Zellen zeigen im Transplantatempfänger ein besseres Anwachsen und höheres Überlebenspotential sowie durchflusszytometrisch eine hohe Expression von CD95 [13].

Bei einem Großteil der Patienten war die Anzahl der naiven $CD4^+$ Zellen nach Transplantation so gering, dass die Auswertung der CD95-Expression auf diesen Zellen nicht möglich war. In Abbildung 37 ist die MFI von CD95 auf naiven $CD8^+$ Zellen beim Stammzellspender vor und nach G-CSF Behandlung sowie im Stammzellempfänger im Verlauf nach Transplantation dargestellt. Dabei zeigte sich ein im Vergleich zum Spender nach G-CSF (MFI 2441) deutlich erhöhtes Expressionslevel an CD95 beim Stammzellempfänger. Die höchsten Werte waren dabei an den Tagen +7 (40087) und +15 (42182) nach Transplantation zu verzeichnen. Im Verlauf nahmen die Expressionslevel bis zu Tag +110 (17256) kontinuierlich ab. Auch an Tag +110 zeigten sich damit jedoch noch erhöhte mittlere MFI-Werte im Vergleich zum Stammzellspender. Außerdem ist der Verlauf der CD95-Expression auf den naiven $CD8^+$ Zellen bei den Patienten Nr. 4 und Nr. 7 separat dargestellt (Abbildung 36). Bei diesen Patienten konnten bereits an Tag +1 bzw. +3 nach Transplantation genügend Zellen isoliert werden um eine Aussage zu treffen. Bei diesen Patienten zeigte sich deutlich die stärkere CD95-Expression im Stammzellspender nach Transplantation und die geringe Expression im Spender. Zudem ist im Verlauf ein kontinuierlicher Rückgang der Expression zu beobachten. Interessanterweise zeigte sich bei Patientin Nr. 4, welche kein ATG erhalten hatte, bei frühen Zeitpunkten nach Transplantation eine deutliche Trennung in $CD95^+$ und $CD95^-$ Populationen.

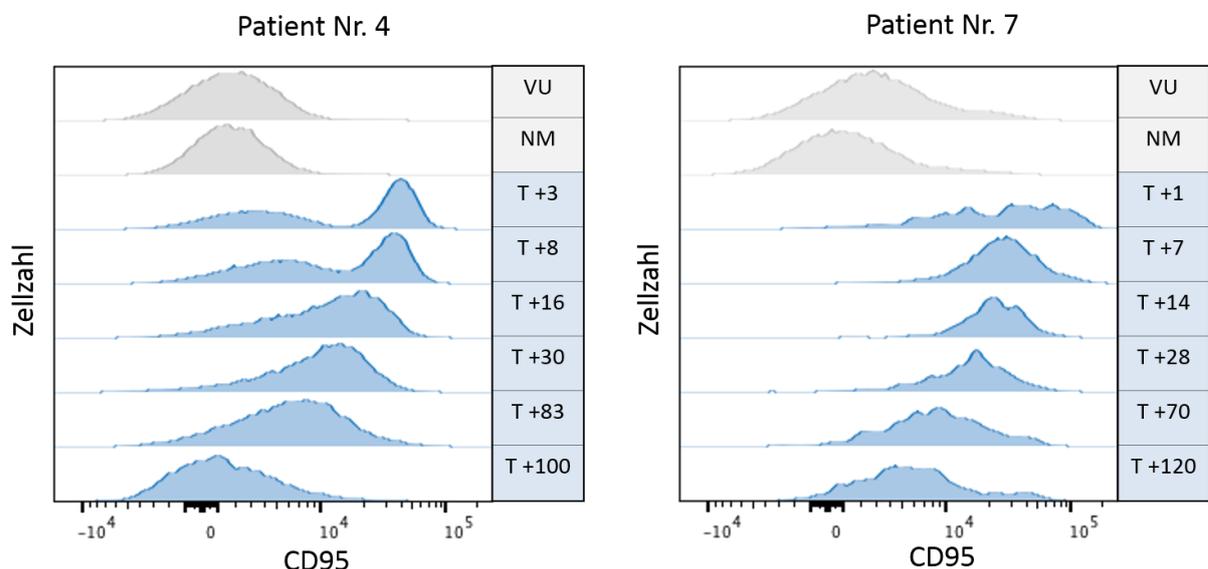


Abbildung 36: CD95-Expression auf naiven ($CD45RA^+CCR7^+$) $CD8^+$ T-Zellen beispielhaft bei zwei ausgewählten Spender/Empfänger-Paaren. Daten des Stammzellspenders: VU=Voruntersuchung (vor G-CSF), NM=nach Mobilisierung (nach G-CSF), Daten des entsprechenden Stammzellempfängers: T +x= Tage nach Transplantation.

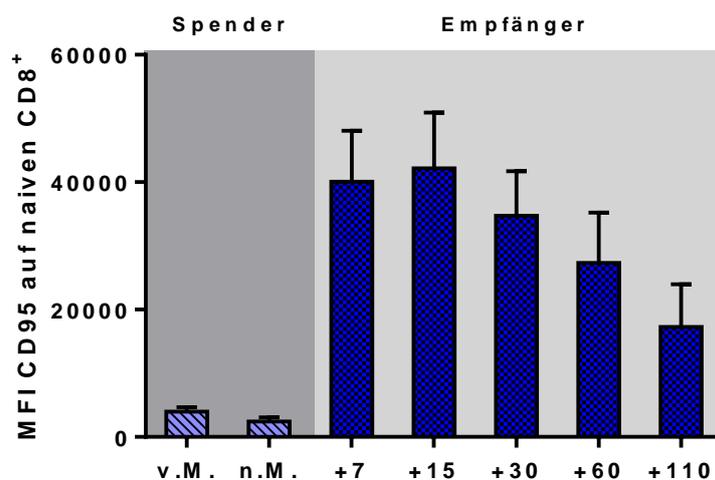


Abbildung 37: CD95-Expression auf naiven ($CD45RA^+CCR7^+$) $CD8^+$ T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach Behandlung mit G-CSF und bei den Stammzellempfängern im Verlauf nach der Transplantation als MFI. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert \pm SEM. v.M. (n=5), n.M. (n=5), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

3.3.2.2 Apoptoseneigung der Gedächtnis-T-Zellen

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß eine Apoptose der Gedächtniszellen nach Transplantation besteht, wurde bei den Stammzellempfängern ebenfalls eine Färbung mit PI und Ann. V vorgenommen. Auch hier war der Anteil der PI^+ , also der Anteil an spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen vernachlässigbar gering, sodass in den folgenden Abbildungen lediglich der Anteil an Ann. V^-PI^- lebenden Zellen dargestellt ist. Die Differenz zu 100% machten dabei die früh-apoptotischen, Ann. V^+ und PI^+ Zellen aus. Die Auswertung zeigt, dass es zu keinem deutlich veränderten Anteil an Ann. V^- Zellen nach Transplantation kam (Abbildung 38). Die Apoptose der Gedächtniszellen ist folglich nicht erhöht im Vergleich zu Gedächtnis-T-Zellen beim Stammzellspender. An den frühen Zeitpunkten nach Transplantation lag der Anteil an lebenden Gedächtniszellen mit 87,1% der $CD4^+$ und 88% der $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen sogar eher im Bereich der Rate beim Spender nach Behandlung mit G-CSF. Es schien im Verlauf nach Transplantation zu einer langsamen Abnahme des Anteils an lebenden Zellen zu kommen. So betrug der Anteil der lebenden Zellen an den $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen an Tag +110 71,6%, bei den $CD8^+$ Gedächtniszellen waren es 77,4%. Im Vergleich zu den Untersuchungen beim Stammzellspender schwankten die Werte beim Empfänger jedoch stärker. So zeigte die Patientin, welche kein ATG erhalten hatte, an Tag +60 und +110 einen erhöhten Anteil von 38 bzw. 45%

Ann. V⁺ früh apoptotischen CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Bei diesen Ergebnissen sei darauf hingewiesen, dass nur bei wenigen Patienten und nicht zu allen geplanten Zeitpunkten Daten erhoben werden konnten. Dies war durch die geringe Zellzahl nach Transplantation bedingt.

Anteil der lebenden Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen

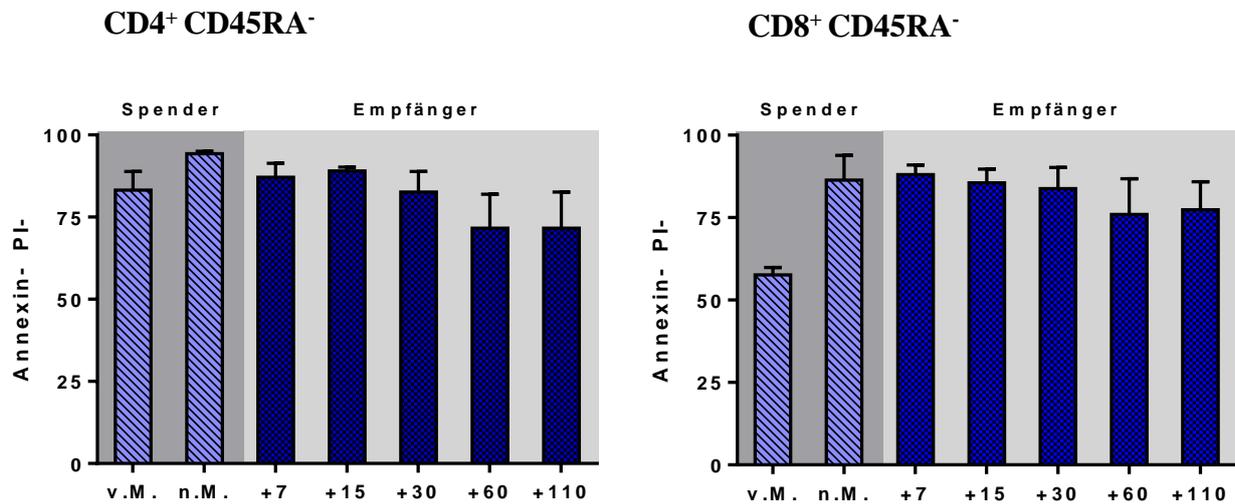


Abbildung 38: Anteil der Ann. V⁻ PI⁻ lebenden Zellen an den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=2), n.M. (n=2), Tag +7 (n=3), Tag +15 (n=4), Tag +30 (n=4), Tag +60 (n=3), Tag +110 (n=3)

3.3.2.3 Proliferationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen

Die Untersuchungen hinsichtlich des Proliferationsverhaltens der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen zeigten im Vergleich zu den Stammzellspendern erhöhte Werte. So lag der Anteil an Ki67-exprimierenden Zellen im Verlauf nach der Transplantation im Mittel zwischen 9,3% und 17,0% bei den CD4⁺ und zwischen 8,9% und 28,1% bei den CD8⁺ Gedächtniszellen (Daten nicht als Grafik dargestellt). Dies zeigt die deutlich erhöhte Proliferation sowohl der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Gedächtniszellen im Empfänger.

3.3.2.4 Gewebemarker und *Homing*-Moleküle auf Gedächtnis-T-Zellen

Des Weiteren wurde auf den CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen der Verlauf der Gewebemarker untersucht. Dabei konzentrierte sich diese Arbeit auf die Marker CD69, $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CLA. Wie oben beschrieben, ist CD69 zum einen als Marker für T_{RM} Zellen relevant, zum anderen wurde gezeigt, dass CD69 bei der Migration der T-Zellen in das Knochenmark eine Rolle spielt. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CLA sind an der Migration der Gedächtniszellen in die Gewebe Darm bzw. Haut

beteiligt. Die Analyse dieser Marker nach der Transplantation soll die mögliche Migration der Zellen in diese Zielgewebe darstellen.

CD69

Bei der Analyse der CD69-Expression zeigte sich, wie in Abbildung 40 dargestellt, sowohl bei den CD4⁺ als auch bei den CD8⁺ Gedächtniszellen zunächst ein höherer Anteil an CD69⁺ Gedächtniszellen an Tag +7 nach Transplantation (3,5% bei CD4⁺ und 11,4% bei CD8⁺) gegenüber dem Anteil beim Stammzellspender. Im weiteren Verlauf fiel der Anteil an CD69⁺ Gedächtniszellen ab und näherte sich bis Tag +60 (1,6% bei CD4⁺ und 3,6% bei CD8⁺) und +110 (1,3% bei CD4⁺ und 5% bei CD8⁺) dem Niveau, welches bei gesunden, unbehandelten Stammzellspendern zu finden war. Zudem fällt auf, dass die CD69-Expression auf den CD8⁺ Gedächtniszellen deutlich höher ist als auf den CD4⁺ Gedächtniszellen (Abbildung 39). Bei den absoluten Zellzahlen konnte eine kontinuierliche Zunahme im Verlauf nach Transplantation bis Tag +110 beobachtet werden (Abbildung 39).

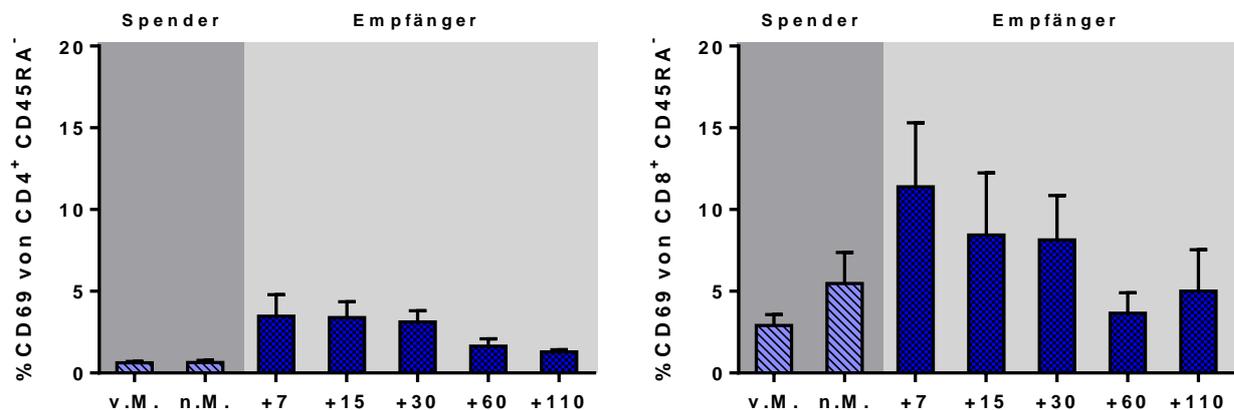


Abbildung 39: Anteil der CD69⁺ Zellen an den CD8⁺ und CD4⁺ Gedächtniszellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Stammzellempfängern nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

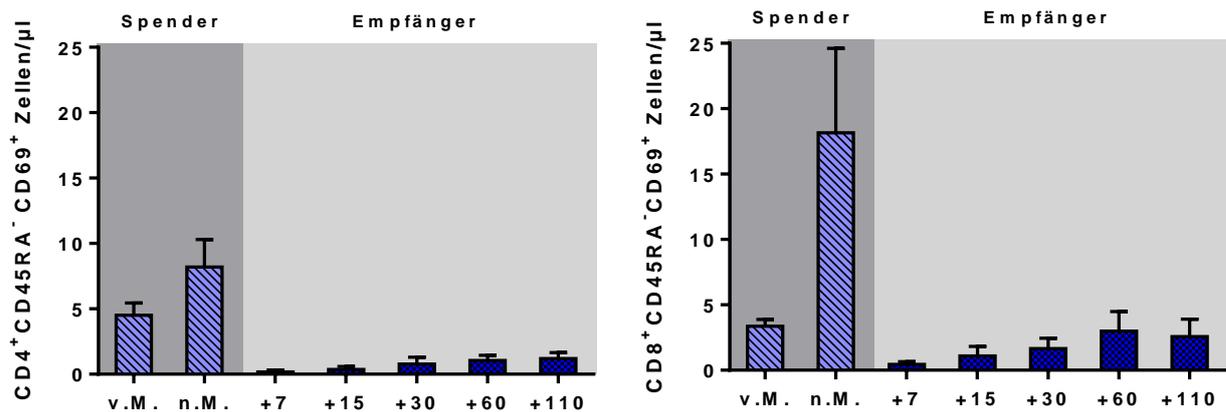


Abbildung 40: Anzahl der CD69-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5)

$\alpha 4\beta 7$ -Integrin

Wie im Abschnitt 3.2.2.4 erläutert, war der prozentuale Anteil an $\alpha 4\beta 7$ -Integrin-exprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern nach G-CSF leicht erniedrigt gegenüber dem Anteil vor Behandlung mit G-CSF. Die Analyse der $\alpha 4\beta 7$ -Expression im Stammzellempfänger ergab eine erniedrigte Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf den CD4⁺ Gedächtniszellen zu den frühen Zeitpunkten Tag +7 (12,5%) und Tag +15 (13,5%) nach Transplantation, die dann im Verlauf kontinuierlich auf 35,3% anstieg (Abbildung 41). Bei den CD4⁺ Gedächtniszellen fiel auf, dass die Expression an Tag +110 mit 35,3% deutlich oberhalb der durchschnittlichen Expression im Spender vor Behandlung mit G-CSF (18,5%) lag. Bei den CD8⁺ Gedächtniszellen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Werten beim Stammzellspender und Stammzellempfänger. Obwohl hier beim Spender im Mittel noch ein Anteil von 36,2% der Gedächtnis-T-Zellen $\alpha 4\beta 7$ -Integrin exprimierten, so waren im Stammzellempfänger an Tag +7 nach Transplantation im Mittel nur 15,2% der Gedächtnis-T-Zellen positiv für $\alpha 4\beta 7$ -Integrin. Interessanterweise zeigte sich im weiteren Verlauf auch hier ein Anstieg der $\alpha 4\beta 7$ ⁺ Population. Bei den CD8⁺ T-Zellen näherte sich der Mittelwert an Tag +30 den Werten beim Stammzellspender an. Auffallend war dabei, dass bei der einen Patientin, die keine ATG im Rahmen der Konditionierungstherapie bekommen hatte, an Tag 8 nach allo-HSZT der Anteil der $\alpha 4\beta 7$ ⁺ Gedächtnis-T-Zellen an den CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen 27,1% und an den CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen 51,3 % betrug. Anders als bei den anderen Patienten, bei denen die $\alpha 4\beta 7$ -Expression

zunächst gering ausgeprägt war und im Verlauf anstieg, war die Expression damit bei dieser Patientin schon kurz nach der Transplantation hoch.

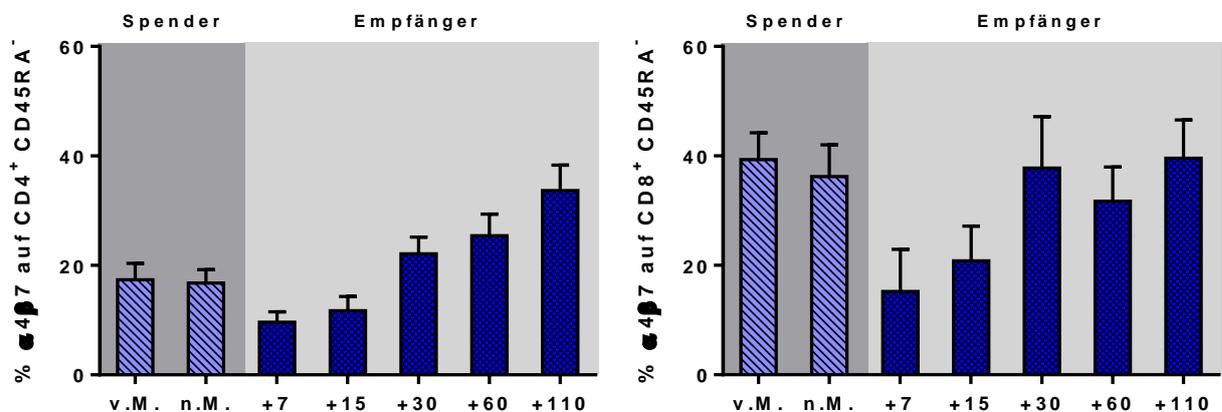


Abbildung 41: Anteil der $\alpha_4\beta_7^+$ Zellen an den CD8⁺ und CD4⁺ Gedächtniszellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5)

Die absolute Anzahl der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen stieg im Verlauf nach Transplantation kontinuierlich bis Tag +60 (31 Zellen/ μ l bei CD4⁺ und 15 Zellen/ μ l bei CD8⁺) an. An Tag +110 stagnierte die Zahl der CD4⁺ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen (31 Zellen/ μ l), die CD8⁺ $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen fielen leicht ab (8 Zellen/ μ l). Die absoluten Zahlen blieben damit auch an Tag +110 deutlich unter den mittleren Werten beim gesunden unbehandelten Spender (Abbildung 42).

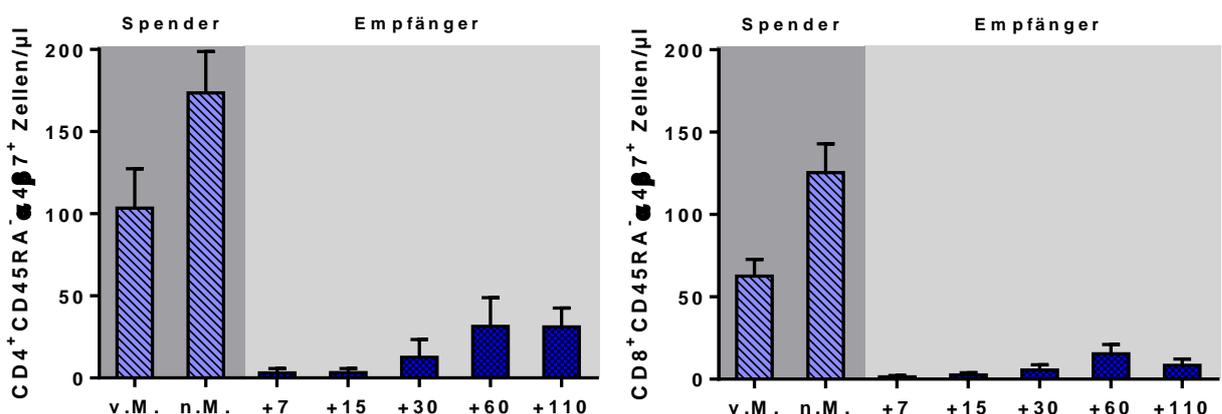


Abbildung 42: Anzahl der $\alpha_4\beta_7$ -exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5)

CLA

Da die Expression von CLA auf den CD8⁺ Gedächtniszellen nach Transplantation stark variierte, wurden die Patienten in zwei Gruppen mit untereinander ähnlichen Verläufen eingeteilt. Bei zwei Patienten verlief die Expression ansteigend auf einem sehr geringen Niveau. Diese Patienten wurden in Abbildung 43 zusammengefasst dargestellt. Interessanterweise exprimierten bei diesen Patienten an Tag +7 im Mittel nur 0,26% der CD8⁺ Gedächtniszellen CLA. Im Verlauf nach Transplantation zeigte sich ein Anstieg auf 2,3%. Damit war die Expression über den gesamten Zeitraum der Beobachtung deutlich unter den Werten von 15% beim unbehandelten Spender bzw. 8,4% beim Stammzellspender nach G-CSF. Bei den anderen Patienten zeigte sich wie in Abbildung 44 dargestellt, zu den frühen Zeitpunkten eine mittlere Expression von 10,5% an Tag +7 und 10,9% an Tag +15. Im weiteren Verlauf nahm die Expression von CLA bei diesen Patienten ab (3,3% an Tag +110).

Bei den CD4⁺ Zellen zeigten sich sehr unterschiedliche Ergebnisse, sodass eine Einteilung in Gruppen nicht sinnvoll erscheint. Fasst man die Werte zusammen, so scheint es zu einem Abfall bis Tag +60 zu kommen, an Tag +110 zeigte sich ein Anstieg (Abbildung 44).

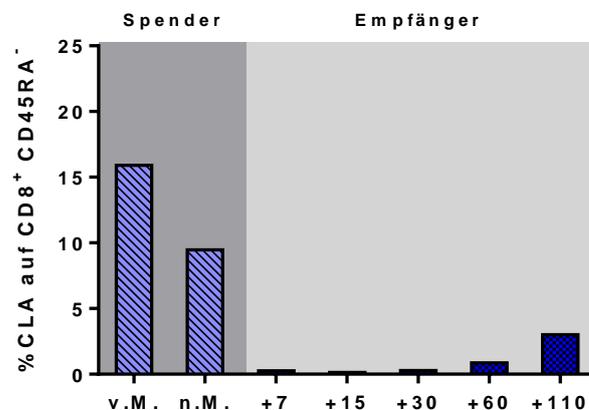


Abbildung 43: CLA-Expression auf den CD8⁺ Gedächtniszellen bei zwei ausgewählten Spender/Empfänger-Paaren. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=2), n.M. (n=2), Tag +7 (n=2), Tag +15 (n=2), Tag +30 (n=2), Tag +60 (n=2), Tag +110 (n=2).

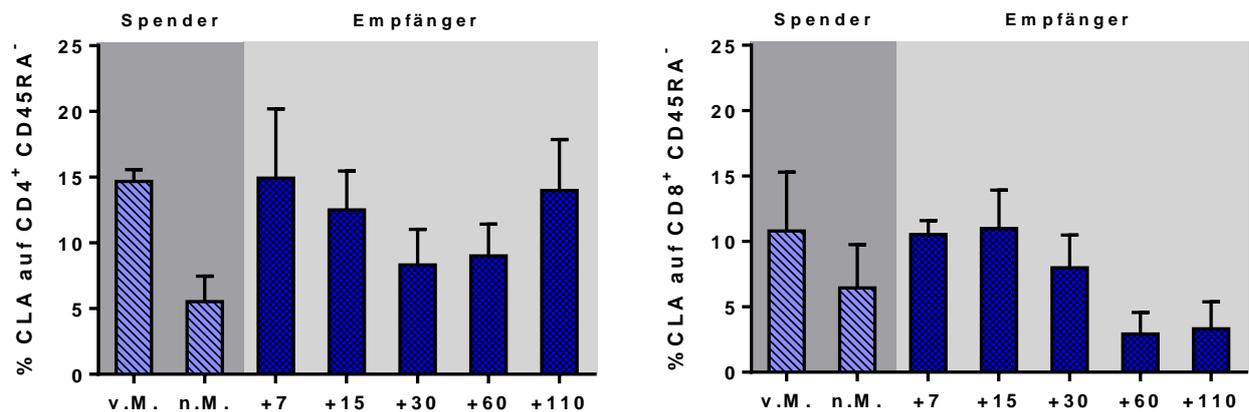


Abbildung 44: CLA-Expression auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. CD4: v.M. (n=4), n.M. (n=4), Tag +7 (n=4), Tag +15 (n=4), Tag +30 (n=4), Tag +60 (n=3), Tag +110 (n=3). CD8: v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5).

Die absolute Zellzahl der CLA⁺ CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen zeigte einen Anstieg über die Zeit von Tag +7 bis Tag +110 (von 3 auf 18 bei den CD4⁺ bzw. von 0,3 auf 5 Zellen/ μ l bei den CD8⁺) nach Transplantation (Abbildung 45). Auch hier waren die absoluten Zellzahlen auch an Tag +110 noch deutlich unter den Zellzahlen beim gesunden Spender.

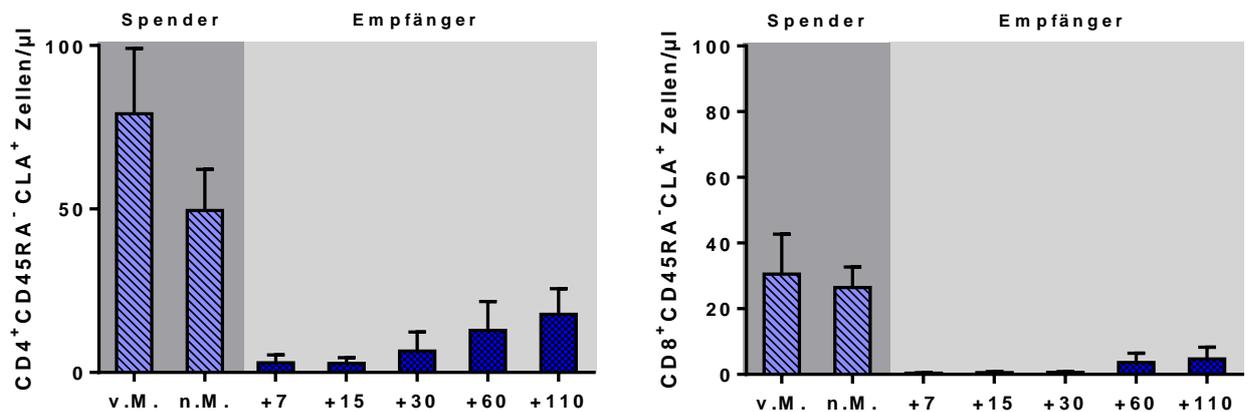


Abbildung 45: Anzahl der CLA-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=6), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=5), Tag +110 (n=5)

3.3.2.5 α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen

Da DEFA1-3 von der Arbeitsgruppe, wie in Abschnitt 3.2.5 beschrieben, als ein potentieller Marker für Zellen aus dem Knochenmark bzw. ein Knochenmark-typisches Milieu identifiziert wurde und sich auch in den Untersuchungen der Stammzellspender eine signifikant höhere DEFA1-3 Expression auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen nach Behandlung mit G-CSF zeigte, wurde der Verlauf der DEFA1-3 Expression auf den Gedächtnis-T-Zellen im Transplantatempfänger untersucht (Abbildung 46). Bei den Stammzellempfängern zeigten sich an Tag +7 nach Transplantation eine MFI von 1133 bei den CD4⁺ und eine MFI von 937 bei den CD8⁺ Zellen. An Tag +15 stieg die Expression bei den CD4⁺ Gedächtniszellen auf 5729 und bei den CD8⁺ Gedächtniszellen auf 5797. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einem Abfall der Mittelwerte auf 1790 (CD4⁺) bzw. 1605 (CD8⁺) an Tag +110.

CD4⁺ Gedächtniszellen

CD8⁺ Gedächtniszellen

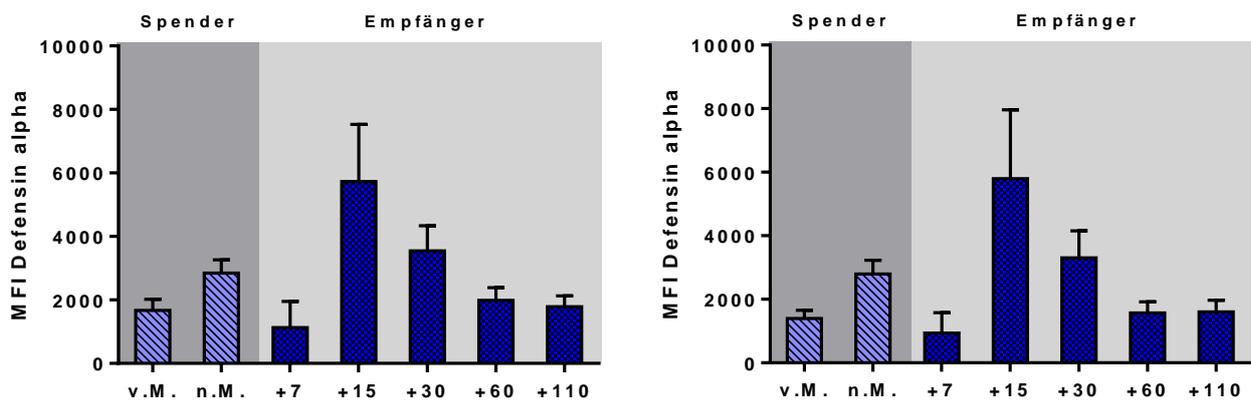


Abbildung 46: Verlauf der Defensin alpha-Expression auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen bei den Stammzellspendern vor und nach G-CSF und bei den Empfängern im Verlauf nach der Transplantation. Werte der Stammzellspender vor (v.M.) und nach Mobilisierung (n.M.) mit G-CSF sind als hellblaue Balken, Werte der entsprechenden Stammzellempfänger sind als dunkelblaue Balken dargestellt. Die Proben wurden im Mittel an Tag +7, +15, +30, +60 und +110 nach Transplantation untersucht. Striche und Balken kennzeichnen den Mittelwert +/- SEM. v.M. (n=6), n.M. (n=6), Tag +7 (n=3), Tag +15 (n=6), Tag +30 (n=6), Tag +60 (n=4), Tag +110 (n=5)

3.3.3 CD69 auf Gedächtnis-T-Zellen aus Knochenmark, Tonsillen, Milz und Thymus

Um die Expression von CD69 (Marker für T_{RM} Zellen) auf unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, wurden neben den Färbungen auf Knochenmarkzellen, einzelne Färbungen an den Geweben Milz, Tonsillen und Thymus durchgeführt (Abbildung 47). Dabei bestätigte sich die in der Literatur beschriebene hohe Expression von CD69 auf den Gedächtnis-T-Zellen im Gewebe im Vergleich zu der Expression im peripheren Blut [30] (siehe auch Kapitel 1.2). So betrug der

Anteil der CD69⁺ CD45RA⁻ Zellen an den CD4⁺ T-Zellen in der Milz 68%, bei den CD8⁺ T-Zellen waren 36% der Zellen CD69⁺CD45RA⁻. Auf den T-Zellen der Tonsillen zeigte sich ein Anteil von 44% CD69⁺ CD45RA⁻ Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen und ein Anteil von 18% innerhalb der CD8⁺ T-Zellen. Auch im Thymus konnten CD69⁺ T-Zellen als hoher Anteil an den CD45RA⁻ Zellen detektiert werden. Die hohe Expression von CD69 ist auffällig, denn alle weiteren untersuchten Marker auf den T-Zellen des Thymus waren nicht exprimiert. So waren im Thymus 95% CD69⁺ CD45RA⁻ CD4⁺ Zellen und 91% CD69⁺CD45RA⁻ CD8⁺ zu finden. Im Knochenmark fand sich in den Beispielfärbungen ein Anteil von 19% CD69⁺CD45RA⁻ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen. Innerhalb der CD8⁺ Zellen fand sich ein Anteil von 40% CD69⁺ CD45RA⁻ Zellen. Diese Färbungen verdeutlichen, dass CD69 in Geweben wie hier Milz, Tonsillen, Thymus und Knochenmark hoch exprimiert ist. Insbesondere gilt dies für die CD45RA⁻ Gedächtniszellen.

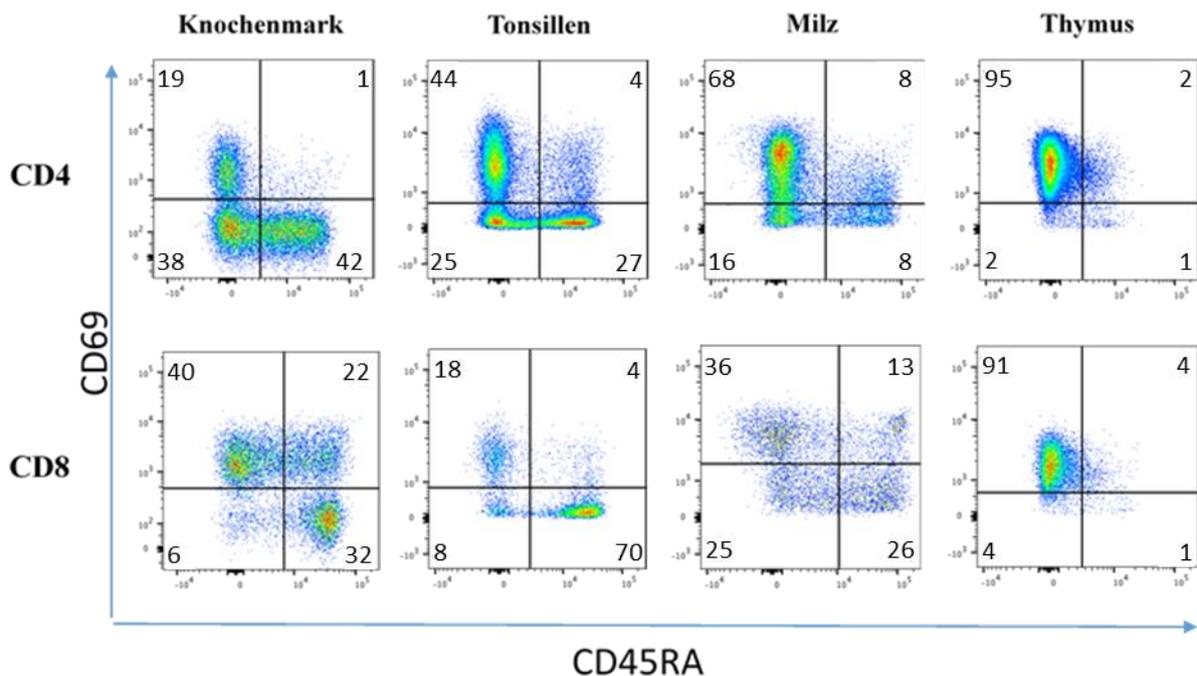


Abbildung 47: Anteil an CD69⁺ Zellen an den CD45RA⁻ Gedächtniszellen in den Geweben Knochenmark, Tonsillen, Milz und Thymus. Dargestellt ist die CD69 Expression auf den CD4 und CD8 Zellen in Abhängigkeit von der CD45RA Expression.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

Im Folgenden soll eine kritische Auseinandersetzung mit der angewandten Untersuchungsmethodik erfolgen. Dies dient dazu die Einschränkungen und Fehlerquellen der erhobenen Ergebnisse aufzuzeigen um die Grundlage für die darauffolgende Interpretation der Ergebnisse zu schaffen.

Streitz et al. haben gezeigt, dass bei optimierten Panels zur Charakterisierung von Leukozytenpopulationen eine Variabilität von 0.05% bis 30% zwischen verschiedenen Zentren und eine Variabilität von 0.05% bis 20% bei Intra-Assay Tests, d.h. parallelen Färbungen derselben Blutprobe unter gleichen Bedingungen durch dieselbe Person besteht. Dabei schwanken insbesondere die Werte der kleinen Populationen. Die Variabilität der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen war in den Untersuchungen von Streitz et al. unter 10%. [95] Dies zeigt, dass die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen eine unterschiedlich ausgeprägte Variabilität aufweisen.

Des Weiteren bestehen zahlreiche Faktoren, welche die Variabilität der mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse beeinflussen können. Dies betrifft alle beteiligten Prozesse von der Blutentnahme bis zur Auswertung der erhobenen Werte. Bei der Blutentnahme kann die Wahl des genutzten Antikoagulans das Ergebnis beeinflussen [96]. In dieser Arbeit wurde zunächst EDTA-Blut verwendet. Da dies einen Einfluss auf Färbungen mit Annexin haben kann, erfolgte im Verlauf eine Umstellung auf heparinisieretes Blut. Dabei wurden gepaarte Proben immer in dem gleichen Antikoagulans abgenommen. Ein wichtiger Faktor ist die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Verarbeitung der Probe. Die Färbungen müssen innerhalb von 4 Stunden nach Entnahme durchgeführt werden, um die Variabilität gering zu halten (<10% Abweichung) [95]. In dieser Arbeit erfolgte in der Regel eine Verarbeitung der Proben innerhalb von 4 Stunden. Bei zwei der Proben war die zeitnahe Verarbeitung nicht möglich, sodass die Proben kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt untersucht wurden. Eine Probe wurde am Folgetag verarbeitet. Unterschiede in den Ergebnissen können sich zudem aus Einwirkzeit und Temperatur während der Färbung sowie den genutzten Fluorochrom-Konjugaten und Titern ergeben [96]. In unserer Arbeit wurden die Einwirkzeiten und die Temperatur konstant gehalten, die Antikörper wurden titriert. Bezüglich der Messung am Durchflusszytometer ist die Kompensation notwendig, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten [96]. Die Kompensation wurde in dieser Arbeit mittels automatischer Berechnung und Beads durchgeführt. Das Panel-Design,

also die Zusammenstellung der Antikörper-Fluorochrom-Konjugate sowie die verwendeten Klone beeinflussen die Ergebnisse. Einer der wichtigsten Faktoren, welcher die Variabilität der Ergebnisse beeinflusst sind Unterschiede im Gating [96]. Um diese möglichst gering zu halten wurde alle Auswertungen von einer Person durchgeführt.

Bezüglich der Genauigkeit der Methode betreffend die Untersuchungen in dieser Arbeit lassen sich keine exakten Werte angeben. Unter Einbeziehung der oben genannten Faktoren ist jedoch von einer hinreichenden Genauigkeit, insbesondere für die größeren Populationen auszugehen. Die hier dargestellten Ergebnisse sollen Tendenzen aufzeigen und sind unter Berücksichtigung der genannten Fehlerquellen zu betrachten. Insbesondere bei den Analysen der kleineren Populationen sollten in weiteren Studien größere Stichproben untersucht werden um die Ergebnisse zu validieren.

4.2 Ergebnisdiskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Wirkung von G-CSF auf die Verteilung von Immunzellpopulationen beim Stammzellspender durchgeführt. Ziel der Arbeit war dabei eine umfassende Charakterisierung des Stammzelltransplantats hinsichtlich der Gedächtnis-T-Zellen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die GvHD durch naive und nicht durch Gedächtnis-T-Zellen verursacht wird [97-100]. Somit stellen Gedächtnis-T-Zellen interessante Kandidaten für einen adoptiven Zelltransfer nach allogener Stammzelltransplantation dar. Zudem haben Studien gezeigt, dass es einen Zusammenhang zwischen der Transplantatzusammensetzung und dem klinischen Verlauf des Transplantatempfängers nach allo-HSCT gibt. Als relevant für den klinischen Verlauf zeigte sich die Zusammensetzung der Immunzellpopulationen, also beispielsweise der Anteil an B-Zellen und die absolute Anzahl an naiven CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ Effektor-Gedächtniszellen im Transplantat [9, 19]. Auch ist beschrieben, dass CMV- [4] und Tetanus- [3] spezifische Gedächtnis-T-Zellen und *Hämophilus Influenza*-spezifische Gedächtnis-B-Zellen [2] auf den Transplantatempfänger übertragen werden und dort persistieren. Es fehlen bisher jedoch detaillierte Untersuchungen des G-CSF-mobilisierten, peripheren Stammzellapheresats, welche sowohl die phänotypischen als auch die funktionellen Änderungen, die durch die Behandlung mit G-CSF entstehen, einbeziehen. In dieser Arbeit sind erstmals umfassende Analysen der durch Gewebemarker und *Homing*-Moleküle charakterisierten Subpopulationen und ihre Veränderung durch G-CSF durchgeführt wurden. Zudem erfolgte die Untersuchung von Proliferations- und Aktivierungsmarkern. Somit können Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte der transplantierten Gedächtnis-T-Zellen gezogen werden. Durch die Analyse der Gedächtnis-T-Zell-Merkmale im Knochenmark ist zudem ein Vergleich zwischen

dem G-CSF mobilisierten peripheren Blut und dem Knochenmark als potentielle Quelle der Mobilisierung möglich. Aufbauend auf den Ergebnissen im Stammzellspender wurden erste Untersuchungen zu dem Schicksal der Immunzellpopulationen im Transplantatempfänger durchgeführt.

4.2.1 Stammzellspender

4.2.1.1 T-Zell-Populationen und Subpopulationen

Bereits in früheren Studien wurde die erhöhte Anzahl von T-Zellen nach Behandlung mit G-CSF im Vergleich zum unbehandelten peripheren Blut beschrieben [101-103]. Tayebi *et al.* zeigten einen 1,7 bis 2-fachen Anstieg der T-Zell-Subpopulationen, welche die Marker CD4, CD8 bzw. CD45RA tragen, nach G-CSF [103]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein Anstieg sowohl der CD3⁺ T-Zellen als auch der CD4⁺ und CD8⁺ T-Gedächtniszellen und der einzelnen Subpopulationen um das 2-3-fache (siehe Abschnitt 3.2.1). Entgegen der Ergebnisse von Sun *et al.* zeigte sich in dieser Arbeit eine leichte, jedoch signifikante Abnahme des Anteils an CD3⁺ Zellen an den Lymphozyten. Sowohl bei Sun *et al.* als auch Tayebi *et al.* wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Verteilung der CD4- und CD8-Populationen beobachtet [102, 103]. Dahingegen fiel in der vorliegenden Arbeit das CD4/CD8 Verhältnis zugunsten der CD8⁺ Zellen von 2,7 vor G-CSF auf 2,0 nach G-CSF. Im Vergleich zum peripheren Blut zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine deutlich geringe CD4/CD8 Ratio im Knochenmark, welche bereits in anderen Publikationen beschrieben worden ist [36, 104]. Tayebi *et al.* zeigten einen moderaten, jedoch signifikanten Anstieg der CD3⁺CD45RA⁺ Zellen nach G-CSF [103]. Einhergehend damit wurde in der vorliegenden Arbeit eine leichte und bei den CD4⁺ T-Zellen signifikante Abnahme des Anteils an CD45RA⁻ Gedächtnis-Zellen beobachtet. Aufgrund der geringen prozentualen Abnahme ist sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Tayebi *et al.* ein Anstieg der absoluten Zellzahl der Gedächtnis-T-Zellen zu verzeichnen [103]. Betreffend die Subpopulationen zeigte sich ein Abfall der T_{EM} innerhalb der CD4⁺ T-Zellen sowie ein Anstieg der T_{naive} Population innerhalb der CD8⁺ Zellen. Die Unterschiede waren dabei gering, jedoch signifikant. Yakoub-Agha *et al.* beschreiben, dass sich die Verteilung der Subpopulationen in ihren Arbeiten nicht substantiell änderte [105].

4.2.1.2 Funktionelle Eigenschaften der mobilisierten Gedächtnis-T-Zellen

Es stellte sich die Frage, wodurch die beschriebene Zunahme der absoluten Anzahl an Gedächtniszellen im peripheren Blut nach Behandlung mit G-CSF zustande kommt. G-CSF beeinflusst sowohl die Proliferation als auch das Überleben und die Differenzierung neutrophiler Granulozyten und führt damit zu deren Zunahme im Blut bei Infektionen [81, 106]. Um zu

untersuchen, ob eine vermehrte Proliferation auch bei den Gedächtnis-T-Zellen zu beobachten ist und es dadurch zu einer Zunahme der Zellzahl kommt, wurde in dieser Arbeit die Expression von Ki67 als Marker für Proliferation untersucht (siehe Abschnitt 3.2.3). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung mit G-CSF. Interessanterweise kam es tendenziell eher zu einer Abnahme der Ki67-Expression und damit des Proliferationspotentials. Dieses Ergebnis geht einher mit der auch bei den anderen Oberflächenmerkmalen zu beobachtenden Tendenz, dass nach Behandlung mit G-CSF eine Annäherung an die Charakteristika der Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark erfolgt, denn Knochenmark-Gedächtniszellen zeigen wie in anderen Studien beschrieben, ebenfalls eine geringere Expression von Ki67 als die des peripheren Blutes [31, 37]. Ukena *et al.* zeigten, bei einer höheren Anzahl an untersuchten Proben, eine signifikante Abnahme der Ki-67 Expression in regulatorischen T-Zellen nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF [107]. Dies lässt vermuten, dass anders als bei neutrophilen Granulozyten, keine Zunahme aufgrund vermehrter Proliferation stattfindet.

Zudem wurde die Expression des Aktivierungsmarkers HLA-DR untersucht (siehe Abschnitt 3.2.3). Dieser zeigte eine leichte Abnahme nach Behandlung mit G-CSF auf den CD4⁺ Gedächtniszellen, wohingegen auf den CD8⁺ Gedächtniszellen eine leichte Zunahme zu verzeichnen war, auch wenn die Werte hier stark schwankten. Tayebi *et al.* berichten über eine Abnahme von HLA-DR nach Behandlung mit G-CSF. Dabei wurden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen insgesamt betrachtet, während in dieser Arbeit im speziellen die Gedächtniszellen untersucht wurden [103]. In anderen Studien wurde eine höhere HLA-DR-Expression auf den CD8⁺ Zellen im Knochenmark als im peripheren Blut beschrieben [108].

In einem weiteren Schritt wurde die Viabilität der Gedächtnis-T-Zellen vor und nach G-CSF Behandlung mit Hilfe der Annexin/Propidiumiodid-Färbung analysiert (siehe Abschnitt 3.2.2). Dies ist auch deshalb von großem Interesse, da die Apoptoseneigung der übertragenden Gedächtnis-T-Zellen Hinweise auf das spätere Überleben der Zellen im Stammzellempfänger geben kann. Interessanterweise zeigte sich nach G-CSF-Behandlung eine deutlich geringere Apoptoseneigung der Gedächtnis CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als bei den Zellen der Spender vor G-CSF. Es fällt auf, dass die Veränderungen nach G-CSF auch hier den Merkmalen im Knochenmark ähneln. So zeigt sich im Vergleich zwischen Knochenmark und peripherem Blut die deutlich geringere Apoptoseneigung der Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks. Dies könnte darauf hindeuten, dass Gedächtnis-T-Zellen, die mit Hilfe von G-CSF in das Blut mobilisiert wurden sind, gegenüber den Gedächtniszellen im peripheren Blut des unbehandelten Spenders einen

Überlebensvorteil aufweisen. Diese geringere Apoptoseneigung der Zellen könnte auch im Empfänger erhalten bleiben.

Zusammenfassend zeigen die Daten hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften eine Abnahme der Proliferation sowie eine Abnahme der Apoptoseneigung nach Behandlung mit G-CSF. Dies lässt vermuten, dass die Zunahme der Gedächtnis-T-Zellen nicht durch eine vermehrte Proliferation zustande kommt. Ein Grund für die Zunahme könnte dementsprechend die geringere Apoptoseneigung nach G-CSF-Mobilisierung sein. Da dies allein nicht den starken Anstieg der Gedächtnis-T-Zellen nach G-CSF erklären kann, vermuten wir eine Mobilisierung der Gedächtnis-T-Zellen aus den Geweben als weitere Ursache für den Anstieg.

4.2.1.3 Mobilisierung von gewebespezifischen Gedächtnis-T-Zellen

Auswahl der untersuchten Gewebemarker und Homing-Moleküle

Ausgehend von der Hypothese, dass die Zunahme der Gedächtnis-T-Zellen durch eine Mobilisierung bedingt sein könnte, soll nun die Frage untersucht werden, in welchen Geweben die mobilisierten Zellen ihren Ursprung haben. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Gewebemarker betrachtet (siehe Abschnitt 3.2.4). CD69 und CD103 wurden gewählt, da diese als Marker für gewebeständige Gedächtniszellen (engl. *tissue resident memory T cells*, T_{RM}) beschrieben sind [30]. Untersucht werden sollte, ob gewebeständige Gedächtniszellen durch G-CSF ins Blut mobilisiert werden.

Zudem wurden in der vorliegenden Arbeit sogenannte *Homing*-Moleküle untersucht, die spezifisch für bestimmte Gewebe sind. Die Expression von Oberflächenmolekülen wie Integrine und Chemokinrezeptoren spielt bei der Spender-gegen-Empfänger-Krankheit eine wichtige Rolle, da die alloreaktiven T-Zellen über diese Oberflächenmarkmale in ihre Zielgewebe migrieren und dort die Spender-gegen-Empfänger-Krankheit auslösen [109]. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist ein Oberflächenmolekül, das eine Migration der Lymphozyten in den Darm und in die assoziierten lymphatischen Gewebe veranlasst [110]. CLA (engl. *Cutaneous lymphocyte antigen*) ist ein Oberflächenmolekül auf Gedächtnis-T-Zellen, das diese selektiv in die Haut migrieren lässt [111]. Die Auswahl von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin und CLA erfolgte, um zu untersuchen, ob Gedächtnis-T-Zellen aus den Geweben Darm und Haut mobilisiert werden. Zudem sind diese Marker interessant, da deren Zielorgane, also der Darm und die Haut, wichtige Organe bei der GvHD darstellen und eine Migration der Gedächtnis-T-Zellen in diese Organe Einfluss auf das Auftreten einer Spender-gegen-Empfänger-Krankheit haben könnte.

Des Weiteren wurden Chemokinrezeptoren betrachtet. Chemokinrezeptoren sind Oberflächenmoleküle, an die Chemokine binden. Durch die Bindung der Chemokine an den Rezeptor wird die Migration der Zellen in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration (Chemotaxis) veranlasst [112]. In dieser Arbeit wurden die Chemokinrezeptoren CCR6, CCR10, CXCR3 und CRTH2 (engl. *chemoattractant receptor of TH2 cells*) auf Gedächtnis-T-Zellen vor und nach Behandlung der Spender mit G-CSF untersucht. CCR10 und der entsprechende Ligand CCL27 bilden ein für die Haut sehr spezifisches Rezeptor-Ligand-Paar. Ähnlich wie CLA führt die Expression von CCR10 somit zu einer Migration der Gedächtniszellen in die Haut [113, 114]. Gedächtniszellen in der Lunge zeigen eine erhöhte Expression von CCR6 [20]. CXCR3 und CCR6 wurden beschrieben, bei der Entwicklung der Spender-gegen-Empfänger Erkrankung, aufgrund der durch sie vermittelten Migration in die epithelialen Zielgewebe, eine Rolle zu spielen [115, 116]. CRTH2 ist beschrieben spezifisch auf Typ 2-, jedoch nicht auf Typ 1-T-Helferzellen Zellen exprimiert zu sein [117, 118]. Die Auswahl der Chemokinrezeptoren erfolgte, um Unterschiede im Migrationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen nach Behandlung mit G-CSF im Vergleich zu dem Spender vor G-CSF festzustellen.

Expression der Gewebemarker auf den Gedächtnis-T-Zellen

Die Expression von CD69 kennzeichnet gewebeständige Gedächtnis-T-Zellen und ist auf den T-Zellen der verschiedenen Kompartimente unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Expression von CD69 beträgt im peripheren Blut 1-20% auf CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen. In lymphoiden und mukosalen Geweben ist der Marker konstitutiv hochreguliert und auf 60-100% der gewebeständigen Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. [30]

Dies konnten die in dieser Arbeit durchgeführten Färbungen an den Geweben Knochenmark, Tonsillen, Milz und Thymus bestätigen (siehe Abschnitt 3.3.3). In Übereinstimmung mit der Literatur [31] zeigten die CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen der vorliegenden Arbeit im peripheren Blut eine geringe CD69-Expression und eine deutlich höhere Expression im Knochenmark. Die Expression war dabei insbesondere auf den CD45RA⁻ Gedächtnis-T-Zellen hoch, bei den CD45RA⁺ T-Zellen im Knochenmark und im peripheren Blut war im Vergleich eine geringere Anzahl an CD69⁺ Zellen zu finden. Im Vergleich zwischen peripherem Blut vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF lässt sich in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg der CD69-exprimierenden CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen absolut verzeichnen. Betrachtet man den prozentualen Anteil der CD69-exprimierenden Zellen, so zeigt sich lediglich bei den CD8⁺ Gedächtniszellen ein leichter, jedoch signifikanter Anstieg.

CD103 ist als Marker für gewebeständige, epitheliale CD8⁺ Gedächtniszellen von Jejunum, Ileum und Colon sowie den mesenterialen Lymphknoten und der Lunge beschrieben [30]. So konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine genetische Defizienz von CD103 zu einer gestörten Produktion von CD8⁺ T-Zellen in der Darmmukosa [119, 120] und zu einem Verlust der T_{RM} Zellen in der Haut und der Lungen-Mukosa [121, 122] führt. Es wird vermutet, dass über Adhensionsmoleküle wie CD103 zum einen die Bindung der T-Zellen an die Mikroumgebung erfolgt und zum anderen auch das Überleben und die Funktionalität aufrechterhalten wird [123, 124]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Zunahme der absoluten Anzahl an CD8⁺ CD103⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Behandlung mit G-CSF.

Die erhöhten absoluten Zellzahlen der CD69⁺ und CD103⁺ Gedächtniszellen könnten darauf hindeuten, dass gewebeständige Gedächtniszellen mobilisiert werden. Dies scheint jedoch nur in einem geringen Ausmaß stattzufinden, denn hinsichtlich des Anteils der CD69⁺ und CD103⁺ Zellen innerhalb der Gedächtniszellen ließ sich nur ein geringer Anstieg verzeichnen.

$\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist ein Zelloberflächenmolekül, das eine Migration der Lymphozyten in den Darm und in die assoziierten lymphatischen Gewebe veranlasst [22]. Die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin ist auf einem Teil der T-Zellen im peripheren Blut vorhanden [110, 125]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen, welche in den lymphatischen Geweben des Darms aktiviert wurden, innerhalb von zwei Tagen $\alpha_4\beta_7$ -Integrin exprimieren und dadurch in den Darm migrieren können [126]. Auf den jeweiligen Gedächtnis-T-Zellpopulationen können diskrete $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁻ Populationen voneinander unterschieden werden, wohingegen auf den CD45RA⁺ Zellen eine homogene Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin zu finden ist [125]. Diese in der Literatur beschriebenen Expressionsmuster zeigen sich ebenso in der vorliegenden Arbeit. Zur Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark sind bisher keine Angaben aus vorherigen Studien zu finden. Die Auswirkung einer Stammzellmobilisierung mit G-CSF auf die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin wurde bisher ebenfalls nicht untersucht. Durch die Applikation von G-CSF zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Zunahme der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut. Eine mögliche Erklärung wäre die Mobilisierung dieser Zellen aus den lymphatischen Geweben des Darms. Aufgrund der hohen Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin in den lymphatischen Geweben des Darms, wäre dann jedoch auch eine Zunahme des prozentualen Anteils an $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Zellen zu erwarten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Mobilisierung aus dem Knochenmark, denn auch im Knochenmark war eine deutliche Expression von $\alpha_4\beta_7$ auf den Gedächtniszellen zu finden. Die prozentual etwas geringere

Expression im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut, könnte die leichte prozentuale Abnahme von $\alpha 4\beta 7$ nach G-CSF-Behandlung im peripheren Blut erklären.

CLA ist ein Oberflächenmolekül auf Gedächtnis-T-Zellen, das diese selektiv in die Haut migrieren lässt [111]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich keine signifikante Zunahme der CLA⁺ Gedächtnis-T-Zellen nach Behandlung mit G-CSF. Dahingegen zeigte sich eine signifikante prozentuale Abnahme des Anteils der CLA⁺ Zellen an den CD4⁺ bzw. CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Im Vergleich zwischen Knochenmark und peripherem Blut konnte eine deutlich geringere CLA-Expression der Gedächtnis-T-Zellen des Knochenmarks festgestellt werden. Dieses unterschiedliche Expressionsmuster zwischen Knochenmark und peripherem Blut wurde in Bezug auf die CD8⁺ T-Zellen bereits in anderen Studien gezeigt [33]. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich keine Mobilisierung von Gedächtniszellen aus der Haut feststellen.

Die CCR6/CCL20 Achse spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von T-Zellen in die peripheren Gewebe und lymphoiden Organe, die mit Epithelzellen assoziiert sind [115, 127]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CCR6 im Rahmen der akuten GvHD eine Rolle bei der Rekrutierung von alloreaktiven CD4⁺ T-Zellen in die Zielgewebe spielt [115]. In Einklang mit den Ergebnissen von Sun *et al.* [102] konnte in dieser Arbeit eine deutlich reduzierte CCR6-Expression nach Behandlung mit G-CSF gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich einhergehend mit Ergebnissen früherer Studien mit CD8-Gedächtniszellen [33] eine geringere Frequenz von CCR6-exprimierenden Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark als im peripheren Blut, sowie eine geringere Anzahl im Blut nach Behandlung mit G-CSF. Die reduzierte Expression von CCR6 auf den Gedächtniszellen nach G-CSF könnte einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Gedächtniszellen im Empfänger haben.

Sun *et al.* zeigten weiterhin, dass die Expression von CXCR3 auf den CD3⁺ T-Zellen sowie auf den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach G-CSF signifikant abnimmt [102]. Eine Abnahme zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit auf den CD45RA⁻ CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen. Duffer *et al.* [116] haben gezeigt, dass CXCR3 im Rahmen der aGvHD für die Migration der CD8⁺ T-Zellen in die epithelialen Zielorgane nötig ist. He *et al.* konnten im Mausmodell nachweisen, dass die *in vivo* Applikation von CXCR3-Antikörpern über 21 Tage die Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung durch alloreaktive CD8⁺ T-Zellen reduziert [109]. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Blockade der CXCR3 Rezeptor-Ligand Interaktion die Migration der Leukozyten in die Lunge reduziert [128]. Ebenso wie bei den Oberflächenmarkern CLA und CCR6 ist auch für die Expression von CXCR3 bereits in anderen Studien beschrieben, dass diese auf Knochenmark-

CD8⁺ T-Zellen geringer ausgeprägt ist als auf den CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut [33], was wir in dieser Arbeit ebenfalls bestätigen konnten.

Zusammenfassend deutet die absolute Zunahme der CD69⁺, CD103⁺ sowie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ und CCR10⁺ Zellen auf eine G-CSF-abhängige Mobilisierung in das periphere Blut hin. Da CD69 und CD103 Marker für gewebeständige Gedächtniszellen sind, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass gewebeständige Gedächtniszellen mobilisiert werden, auch wenn das Ausmaß des Anstiegs und der prozentuale Anteil an CD69⁺ bzw. CD103⁺ Zellen auch nach G-CSF nicht hoch ist. Der Anstieg der absoluten Anzahl an $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen könnte auf eine Mobilisierung der Gedächtniszellen aus dem Darm hindeuten. Hier zeigte sich jedoch prozentual betrachtet ein Abfall der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Zellen, der aber durch die zusätzliche Mobilisierung von Gedächtniszellen aus anderen Geweben bedingt sein könnte. Es lässt sich anhand dieser Ergebnisse keine eindeutige Aussage bezüglich der Quelle der mobilisierten Stammzellen treffen. Betrachtet man das Gesamtbild der Markerexpression im Vergleich mit den Unterschieden zwischen peripherem Blut und Knochenmark, so lassen sich Ähnlichkeiten feststellen. Dies soll im Folgenden näher betrachtet werden.

4.2.1.4 Das Knochenmark als Quelle für die Mobilisierung von Gedächtnis-T-Zellen

Der Mechanismus von G-CSF und die Anwendung für die Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark lassen vermuten, dass die Zunahme der Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut nach G-CSF durch die Mobilisierung aus dem Knochenmark bedingt sein könnte. So ist beschrieben, dass die Migration der CD8⁺ T-Zellen ins Knochenmark ebenso wie die der Stammzellen über die CXCL12 und VLA-4 Achse vermittelt wird [43, 129-131]. Es liegt daher nahe, dass die Unterbrechung dieser Achse durch G-CSF so wie bei den Stammzellen durch reduzierte Retention zu einer Mobilisierung der T-Zellen und damit auch der T-Gedächtniszellen aus dem Knochenmark führen kann. Daher war es ein Ziel der Arbeit, die T-Zell-Populationen im Knochenmark genauer zu untersuchen und die Unterschiede zwischen peripherem Blut und Knochenmark hinsichtlich der Gedächtnis-T-Zellen zu analysieren. Bewusst wurden auch hier gepaarte Proben von Knochenmark und peripherem Blut gesammelt, um die Unterschiede, die sich daraus ergeben mit den Unterschieden, die sich bei den gepaarten Proben der Stammzellspender vor und nach Behandlung mit G-CSF zeigen, zu vergleichen.

Auswahl der Hüft-TEP-Patienten

Die Proben wurden von Patienten, bei denen aufgrund einer Arthrose des Hüftgelenks die Indikation zur Implantation einer Totalendoprothese des Hüftkopfes gestellt wurde, gesammelt.

Anzumerken ist dabei, dass es sich somit nicht um gesunde Spender wie bei dem Kollektiv der Stammzellspender handelt, sondern um Patienten, die unter einer Arthrose litten und dementsprechend medikamentös behandelt waren. Es ist nicht auszuschließen, dass die Behandlung mit Antiphlogistika und Glukokortikoiden aufgrund der immunologischen Wirkungen einen Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse hatte. Zudem waren die gesunden Stammzellspender im Durchschnitt 16 Jahre jünger als die Patienten, deren Knochenmark untersucht wurde (47 vs. 63 Jahre) und litten folglich seltener an Komorbiditäten.

Vergleich zwischen Knochenmark und peripherem Blut

Wird die Verteilung der Zusammensetzung der T-Zell-Populationen sowie die Markerexpression auf den Gedächtniszellen vor und nach G-CSF mit den Unterschieden zwischen peripherem Blut und Knochenmark verglichen, so zeigt sich, dass die Expression der Marker im peripheren Blut nach Behandlung mit G-CSF der Expression der Marker im Knochenmark ähnelt (siehe Abschnitt 3.2.4). So sinkt der Anteil an CLA^+ , $CXCR3^+$ und $CCR6^+$ Gedächtniszellen deutlich nach Behandlung mit G-CSF und auch im Knochenmark sind diese Marker auf den Gedächtnis-T-Zellen deutlich schwächer exprimiert als im peripheren Blut. Der Anteil der $\alpha 4\beta 7$ -Integrin⁺ Gedächtnis T-Zellen zeigt nur eine leichte Abnahme nach Behandlung mit G-CSF und ist nur wenig geringer auf den Knochenmarks-Gedächtnis T-Zellen exprimiert als im peripheren Blut. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es zu einer Mobilisierung der Gedächtnis T-Zellen aus dem Knochenmark kommt, und die im peripheren Blut vorzufindenden Gedächtniszellen die phänotypischen Eigenschaften aus dem Knochenmark behalten. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Gedächtniszellen auch aus anderen lymphatischen Organen wie z.B. der Milz mobilisiert werden. Eine Ausnahme bildet CD69, welches nach G-CSF-Behandlung nur auf $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen leicht steigt, obwohl laut der hier aufgestellten Hypothese ein deutlicher Anstieg der CD69-Expression nach G-CSF Behandlung auf den $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtniszellen zu erwarten wäre. Shinoda *et al.* beschreiben, dass $CD4^+$ Zellen im Knochenmark das Oberflächenmolekül CD69 für die lokale Persistenz benötigen [132]. Shiow *et al.* zeigten, dass CD69 zu einer Inhibition von S1P1 und damit zu einer Inhibition des Austritts von Lymphozyten aus lymphoiden Geweben führt [133]. Dieser Mechanismus wird auch von Maede *et al.* gezeigt [134]. Dies deutet darauf hin, dass eine bestehende CD69-Expression zu einer Persistenz der Gedächtnis-T-Zellen in lymphoiden Geweben führt. Die geringe CD69-Expression auf den Gedächtniszellen der Stammzellspender nach G-CSF könnte dementsprechend mit einer Herabregulation von CD69 im Rahmen des Austritts der Gedächtnis-T-Zellen aus der Knochenmarknische oder möglicherweise auch anderen lymphatischen Organen erklärt werden.

Denkbar wäre auch, dass selektiv die CD69⁻ Gedächtnis-T-Zellen durch die Behandlung mit G-CSF mobilisiert werden, die CD69⁺ gewebeständigen Gedächtnis-T-Zellen jedoch weiterhin in ihrer Nische verweilen. Da CD69 ebenfalls als früher Aktivierungsmarker für die CD8⁺ T-Zellen gilt [135], könnte der leichte Anstieg der CD69 Expression nach G-CSF auch in der Aktivierung durch G-CSF begründet sein.

α -Defensine als möglicher Marker für Gedächtnis-T-Zellen aus dem Knochenmark

Aufgrund des Expressionsmusters der Oberflächenmerkmale auf den Gedächtnis-T-Zellen nach G-CSF im Vergleich mit dem Knochenmark ergibt sich, wie oben beschrieben, die Vermutung, dass es zu einer Mobilisierung der Gedächtnis-T-Zellen aus dem Knochenmark kommt. Interessant wäre es daher, einen Knochenmark-spezifischen Marker zu untersuchen, um diese Hypothese zu stärken. Microarray-Analysen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die mRNA Transkription der Gene *DEFA1*, *DEFA3* und *DEFA4* in Knochenmark-Gedächtnis-T-Zellen gegenüber der Transkription in Gedächtnis-T-Zellen im peripheren Blut deutlich erhöht ist (Publikation eingereicht). Diese Gene kodieren für Peptide der α -Defensin Familie (HNP1-3; engl. *human neutrophil peptide*). α -Defensine besitzen antivirale und antibakterielle Eigenschaften, indem sie über Porenbildung die Pathogene zerstören können, und werden von Zellen des angeborenen Immunsystems produziert [136, 137]. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die erhöhte α -Defensin-Expression auf den Gedächtnis-B- und -T-Zellen des Knochenmarks durch die spezielle Umgebung der Knochenmarknische induziert wird, vermutlich über einen Exosomen-abhängigen Mechanismus.

Um das Knochenmark als mögliche Quelle der Gedächtniszellmobilisierung nach G-CSF näher zu betrachten, wurden daher in dieser Arbeit intrazelluläre Antikörper-Färbungen der α -Defensine im Blut vor und nach Behandlung der Stammzellspender mit G-CSF durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die intrazelluläre α -Defensin Expression nach Behandlung mit G-CSF ansteigt. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass Gedächtnis-T-Zellen durch G-CSF aus dem Knochenmark in das periphere Blut mobilisiert werden. Auch könnten die Ergebnisse ein Hinweis sein, dass durch G-CSF im peripheren Blut ein Knochenmark-ähnliches Milieu induziert wird. Aufgrund der antiviralen und antibakteriellen Eigenschaften der α -Defensine könnte die Mobilisierung dieser Zellen und die anschließende Übertragung mit dem Transplantat auf den Empfänger vorteilhaft für diesen sein.

4.2.1.5 Direkte und indirekte Effekte von G-CSF auf Gedächtnis-T-Zellen

Die hier aufgestellte Hypothese, dass die Veränderung der Markerexpression in der Mobilisierung von Gedächtniszellen aus dem Knochenmark begründet ist, bedeutet gleichzeitig, dass die Veränderungen durch G-CSF auf einen indirekten Effekt zurückzuführen sind. Ein direkter Effekt von G-CSF auf die Markerexpression der Gedächtniszellen ist jedoch ebenso denkbar, obwohl die Expression des G-CSF-Rezeptors CD114 auf T-Zellen in der Literatur umstritten ist. Die Expression von CD114 auf myeloiden Vorläuferzellen sowie auf reifen neutrophilen Granulozyten und Monozyten konnte gezeigt werden, auf eosinophilen Granulozyten, auf erythroiden Zellen sowie auf Lymphozyten wurde der G-CSF Rezeptor jedoch nicht nachgewiesen [87, 88]. Aus einigen Studien ist bekannt, dass G-CSF zu einem Wechsel der T-Zellen von Typ 1 T-Helferzellen zu Typ 2 T-Helferzellen und damit zu einem eher anti-inflammatorischen Milieu führt [138, 139]. Nawa *et al.* haben gezeigt, dass dieser Wechsel von Typ 1 zu Typ 2 T-Helferzellen durch indirekte Effekte über die Modulation der Monozyten-Funktion erfolgt [140]. Es sind jedoch ebenso Publikationen zu finden, welche einen direkten Effekt von G-CSF auf T-Zellen postulieren. Sloand *et al.* beschreiben einen direkten G-CSF-Effekt *in vitro* auf CD4⁺ Zellen [141], wobei diese Daten kritisch zu sehen sind [142]. Franzke *et al.* zeigten die Expression des G-CSF-Rezeptors und die Induktion und funktionelle Aktivität des Rezeptors nach G-CSF Exposition in T-Zellen auf mRNA-Ebene [89].

In dieser Arbeit wurden CD114 (G-CSF-R, engl. *granulocyte colony-stimulating factor receptor*) Färbungen an erylysiertem Vollblut eines Stammzellspenders nach Behandlung mit G-CSF durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Expression von CD114 bei Monozyten und neutrophilen Granulozyten, jedoch keine Expression bei Lymphozyten und CD45RA⁻ CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen (siehe Abschnitt 3.2.6). Obwohl die Untersuchungen dieser Arbeit darauf hindeuten, dass keine Expression von CD114 auf Gedächtnis T-Zellen zu finden ist und damit auch keine direkte Wirkung möglich wäre, kann aufgrund der hier aufgeführten Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen die direkte Wirkung von G-CSF auf Gedächtnis T-Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Betrachtet man die Veränderungen der Marker CXCR3⁺ und CCR6⁺ auf den Gedächtnis-T-Zellen, so zeigt sich nicht nur prozentual, sondern auch absolut eine Abnahme (Abschnitt 3.2.4). Dies deutet darauf hin, dass neben dem indirekten Effekt der Mobilisierung von CXCR3⁻ und CCR6⁻ Gedächtniszellen aus dem Knochenmark auch ein direkter Effekt, welcher zu einer Herabregulation dieser Marker führt, vorliegt.

4.2.2 Stammzellempfänger

Auswahl der Stammzellempfänger

Ziel der Untersuchungen war es, die Spenderlymphozyten nach der Transplantation im Empfänger nachzuverfolgen. Eingeschlossen wurden zehn Patienten, die eine allogene Stammzellspende eines Familienspenders erhielten. Die Patienten waren heterogen hinsichtlich der Grunderkrankung sowie des Konditionierungsregimes, was bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten ist. Schwierigkeiten ergaben sich durch die geringe Anzahl an T-Zellen insbesondere bei den Patienten, die ATG im Rahmen der Konditionierung erhalten hatten und insbesondere zu den frühen Zeitpunkten nach Transplantation. Dies führte dazu, dass die Untersuchungen eingeschränkt werden mussten.

Kritische Anmerkungen

Bei der Interpretation der gewonnenen Daten ist zu berücksichtigen, dass mit den hier angewendeten Antikörperkombinationen nicht zwischen Lymphozyten, welche trotz der Chemotherapie im Spender persistieren und Lymphozyten, welche mit dem Transplantat vom Spender übertragen worden sind, unterschieden werden kann. Da es sich in den meisten Fällen um intensitätsreduzierte Konditionierungsregimes handelte, ist es möglich, dass nach der Transplantation Zellen des Empfängers persistierten.

Für diese Arbeit wurde zudem angenommen, dass die Zusammensetzung der T-Zell-Populationen im Spender nach G-CSF der Zusammensetzung im Transplantat entspricht. Bei der Stammzellapherese werden die Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und die mononukleären Zellen abgesammelt. Aufgrund des Mechanismus der Apherese ist nicht anzunehmen, dass sich die Zusammensetzung der Lymphozyten-Populationen im Apheresat von der im Labor mithilfe der Biocoll-Trennlösung gewonnen Populationen unterscheidet. Es ist jedoch zu bedenken, dass während der ca. 4-stündigen Apherese weiterhin eine Mobilisierung durch G-CSF stattfindet. Um die exakten Werte der Produktzusammensetzung zu erhalten, wäre es demnach sinnvoll, die zu untersuchenden Proben direkt dem Stammzellapheresat zu entnehmen. In dieser Arbeit stand jedoch zunächst der Vergleich zwischen der Zusammensetzung der Zellpopulationen vor und nach G-CSF-Behandlung im Vordergrund. Daher wurde entschieden, zu beiden Zeitpunkten das periphere Blut der Spender zu untersuchen.

4.2.2.1 Rekonstitution der T-Zell-Populationen und Subpopulationen nach allo-HSZT

Wird der Verlauf der einzelnen T-Zell-Populationen betrachtet, so zeigte sich der Anteil der CD4⁺ Zellen an den CD3⁺ T-Zellen nach der Transplantation deutlich geringer als der Anteil beim

Spender zum Zeitpunkt der Stammzellspende. Der geringe Anteil an CD4⁺ Zellen im Verlauf nach allo-HSZT ist bereits in anderen Studien beschrieben [62]. Insbesondere bei Applikation von ATG ist die Rekonstitution der CD4⁺ Zellen verzögert und es kommt zu einer verstärkten homöostatischen Expansion der CD8⁺ Zellen [143, 144]. Der hohe Anteil an CD8⁺ Zellen bleibt bestehen, an Tag +110 zeigte sich in dieser Arbeit die Tendenz einer Zunahme der CD4⁺ Zellen und einer Abnahme der CD8⁺ Zellen (siehe Abschnitt 3.3.2.1).

Der Anteil an CD45RA⁻ Gedächtniszellen ist insbesondere bei den CD4⁺ Zellen nach allo-HSZT deutlich erhöht im Vergleich zu den Stammzellspendern. Auch in anderen Studien ist beschrieben, dass es nach der Transplantation zunächst zu einer Expansion der CD45RA⁻ Gedächtniszellen kommt. Diese sind entweder Empfänger-Zellen, welche das Konditionierungsregime überlebt haben oder Spender-Zellen, die mit dem Transplantat übertragen wurden. [59]

Die Einteilung in weitere Subpopulationen zeigte, dass bei den CD4⁺ Zellen die T_{EM} Zellen stark zunahmten und alle weiteren Populationen im Verlauf einen sehr geringen Anteil ausmachten. Bei den CD8⁺ Zellen zeigten sich die T_{EM} und T_{EMRA}-Zellen vorherrschend und die T_{CM} und T_{naiven}, obwohl an Tag +7 nach der Transplantation noch vertreten, im Verlauf sehr gering. Grund für die kontinuierliche Abnahme der CCR7-exprimierenden Populationen T_{naive} und T_{CM} könnte die Migration dieser Zellen über CCR7 in die lymphatischen Gewebe sein. Insbesondere der geringe Anteil an naiven Zellen stellt ein Problem bei der Immunrekonstitution dar, da diese Population für die Ausbildung von Zellen mit einem breiten Antigenrepertoire notwendig ist. Diese sind wiederum essentiell für die Infektabwehr und die Abwehr leukämischer Zellen. [145, 146] Grund für den geringen Anteil insbesondere der naiven Zellen kann die Zerstörung des Thymusgewebes durch das Konditionierungsregime, der Einsatz von ATG und das Auftreten von Thymus-GvHD sein [147].

Von einigen Autoren werden CD95⁺ naive Zellen als mögliche Gedächtnis-T-Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften diskutiert (T_{SCM}), welche nach allo-HSZT ein besseres Anwachsen und längeres Überleben aufweisen [13-15, 148]. Für die Identifikation dieser Zellen wird, von Lugli *et al.* die Markerkombination aus CD62L, CCR7 und CD95 vorgeschlagen [149]. (Abbildung 47). Dabei ist der Anteil der CD62L⁻ Zellen sehr gering, sodass sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden wurde, auf diesen Marker zu verzichten. Es ist zu bedenken, dass die Identifikation der T_{SCM} Zellen über die hier verwendeten Marker nur einen Hinweis auf die wahre Population geben kann. Eine genauere Identifikation ist durch die Markerexpression CD3⁺CD8⁺CD45RO⁻CCR7⁺CD45RA⁺CD62L⁺CD27⁺CD28⁺IL7Rα⁺CD95⁺ möglich, wie sie von

Gattinoni *et al.* vorgeschlagen wird [14]. Aufgrund der eingeschränkten Zellzahl wurde sich in dieser Arbeit auf eine möglichst geringe Anzahl an Markern konzentriert.

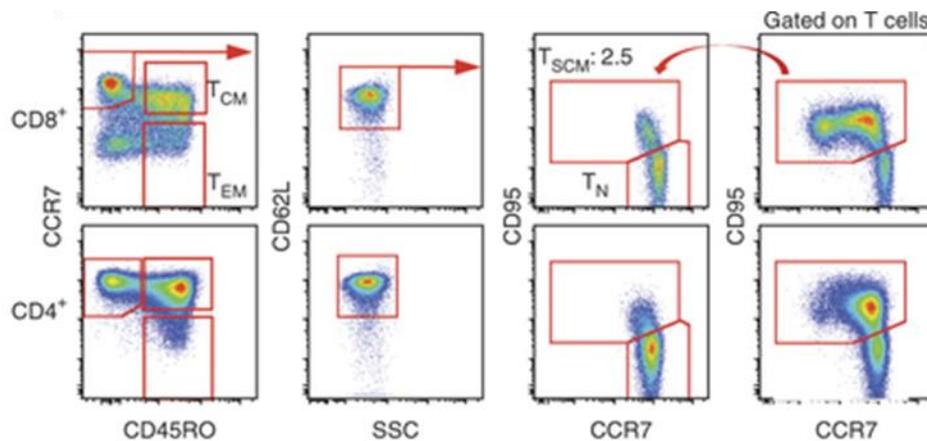


Abbildung 48: Von Lugli *et al.* vorgeschlagene Gating Strategie für CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} Zellen [149]. Zunächst werden die naiven CCR7⁺ CD45RA⁺ Zellen innerhalb der Population der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen identifiziert. Auf diesen Zellen werden dann die CD62L⁺ Zellen ausgewählt. Auf der so identifizierten Population werden die CD95⁺ Zellen als T_{SCM} Population bezeichnet.

Im Verlauf nach Transplantation ließen sich in dieser Arbeit lediglich die CD95⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ naiven Zellen identifizieren. Aufgrund der geringen Anzahl an CD4⁺ Zellen nach Transplantation war eine zuverlässige Identifizierung innerhalb der CD4⁺ naiven Zellen nicht möglich. In dieser Arbeit zeigte sich bei den Spendern vor Transplantation eine niedrige CD95-Expression. Dahingegen zeigte sich wenige Tage nach der Transplantation eine hohe CD95-Expression, die dann aber im Verlauf bis Tag 100 bzw. 120 kontinuierlich abnahm. Bei den Patienten 4 und 7 konnten besonders eindruckliche Verläufe beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.3.2.1). Im Hinblick auf die CD95⁺ naiven Zellen als T_{SCM} kann der Verlauf ein Hinweis darauf sein, dass nach Transplantation vermehrt Zellen mit dem T_{SCM}-Phänotyp zu finden sind, diese jedoch im Verlauf abnehmen bzw. ihren Phänotyp ändern. In einer Studie zu haploidenten Transplantationen wurde ebenfalls gezeigt, dass T-Gedächtnis-Stammzellen nach Transplantation reichlich vorhanden sind [148]. Färbungen mit einer erweiterten Markerkombination zur besseren Identifikation der T_{SCM} sind auch hier nötig, um eine Aussage treffen zu können.

Des Weiteren ist CD95 in der Literatur als FAS-Rezeptor bekannt und frühe Publikationen beschreiben, dass dieser nach Ligandenbindung den Zelltod der entsprechenden Zelle auslöst [150]. Die initial nach Transplantation im Vergleich zum Gesunden stark erhöhte CD95-Expression auf den naiven CD8⁺ Zellen könnte damit ein Hinweis auf die hohe Apoptoseeignung dieser Zellen sein. Die kontinuierliche Abnahme der CD95-Expression nach Transplantation

könnte ein Hinweis auf die abnehmende Apoptoseneigung sein. Die Untersuchungen mit Annexin und PI zeigten jedoch eine geringe Apoptoseneigung der Gedächtniszellen nach der Transplantation (siehe Abschnitt 3.3.2.2). Zudem beschrieben neuere Studien, dass CD95 auf T-Zellen sowohl pro- als auch anti-apoptotischen Eigenschaften haben kann [151]. Weitere Färbungen von CD95 und dem entsprechenden FAS-Liganden könnten zukünftig eine genauere Interpretation erlauben.

4.2.2.2 Funktionelle Eigenschaften der Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSCT

Die Untersuchungen zu der Viabilität der Gedächtniszellen nach allo-HSCT zeigten keine vermehrte Apoptoseneigung der Gedächtniszellen nach Transplantation. Bei zwei der untersuchten Patienten hingegen zeigte sich im Verlauf an Tag +60 und +110 ein Abfall des Anteils an lebenden Zellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass es im Verlauf zu einer erhöhten Apoptoseneigung kommt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen, welche ursprünglich aus dem Knochenmark mobilisiert wurden und damit eine geringere Apoptoseneigung aufweisen, im Verlauf nach der Transplantation ins Knochenmark zurück migrieren und daher die mittlere Apoptoseneigung der im peripheren Blut verbleibenden Zellen im Verlauf zunimmt.

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten der Gedächtnis-T-Zellen beim Stammzellempfänger zeigten eine deutlich höhere Ki67-Expression als beim Stammzellspender. Dies deutet auf eine stärkere Proliferation im Vergleich zum Gesunden hin. In unseren Untersuchungen zeigte sich sowohl auf den CD4⁺ als auch auf den CD8⁺ Gedächtniszellen eine erhöhte Proliferation.

4.2.2.3 Verlauf gewebespezifischer Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSCT

Es sollen im Folgenden einige der untersuchten Marker für gewebeständige Gedächtniszellen bzw. *Homing*-Moleküle und deren Verlauf nach Transplantation diskutiert werden. Dies sind erste Ergebnisse, signifikante Zusammenhänge zwischen den experimentell erhobenen Daten und den klinischen Charakteristika der Stammzellempfänger können aufgrund der geringen Anzahl an Patienten noch nicht ermittelt werden und sollen Gegenstand zukünftiger Studien sein. Die Auswertungen zeigten heterogene Ergebnisse hinsichtlich des Verlaufs der Marker. Es soll sich hier auf die Marker $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, CLA und CD69 konzentriert werden.

$\alpha_4\beta_7$ -Integrin

Eine erhöhte Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen konnte in Studien mit der Entwicklung einer akuten GvHD Erkrankung im Darm nach Stammzelltransplantation korreliert werden [152, 153]. Eine andere Studie findet eine verminderte

Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf $CD8^+ CD45RA^+$ T-Zellen beim Auftreten einer akuten Darm GvHD und führt diese auf die verstärkte Migration der Lymphozyten in den Darm und damit geringerem Auftreten im peripheren Blut zurück [154]. Zudem wurde gezeigt, dass eine verminderte Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin auf den regulatorischen T-Zellen nach allo-HSZT ebenfalls mit der Entwicklung einer akuten GvHD im Darm assoziiert ist [155]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es bei der Transplantation von β_7 -negativen T-Zellen zu einem verminderten Auftreten einer Darm und Leber GvHD kam und dies in der verminderten Migration alloreaktiver T-Zellen in diese Gewebe begründet ist [156].

In dieser Arbeit zeigte die $\alpha_4\beta_7$ -Integrin Expression auf den Gedächtnis-T-Zellen im Verlauf nach Transplantation bei den Patienten, die keine Behandlung mit ATG erhalten haben an Tag +7 eine geringe Expression, die dann im Verlauf zunahm. Auffällig war bei den $CD8^+$ Gedächtniszellen der Unterschied zwischen dem Anteil der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-exprimierenden Zellen im Spender, welcher die Zusammensetzung des Apheresats repräsentiert, und der deutlich geringeren Expression beim Empfänger wenige Tage nach der Transplantation. Ein möglicher Erklärungsansatz ist die Migration der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen kurz nach der Transplantation in den Darm oder das Knochenmark. Die Ursache für den Anstieg der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Zellen im Verlauf nach Transplantation könnte zum einen in der Proliferation der $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Zellen begründet sein. Ein anderer möglicher Erklärungsansatz wäre, dass naive Zellen in den lymphatischen Geweben des Darms Antigenkontakt erfahren und daraufhin eine Entwicklung zu $\alpha_4\beta_7$ -Integrin⁺ Gedächtniszellen stattfindet.

CLA

Cutaneous lymphocyte antigen (CLA) ist ein Oberflächenmolekül auf Gedächtnis-T-Zellen, das diese selektiv in die Haut migrieren lässt [111]. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil an CLA-positiven T-Zellen ca. 3-7 Tage vor Beginn einer aGvHD in vielen Fällen zunimmt [157]. Zudem wurde gezeigt, dass eine verminderte Expression von CLA auf den regulatorischen T-Zellen nach allo-HSZT mit der Entwicklung einer GvHD der Haut assoziiert ist. [155] In dieser Arbeit zeigten sich sehr unterschiedliche Verläufe der CLA-Expression. Bei zwei Patientinnen zeigte sich eine sehr geringe CLA-Expression auf den $CD8^+$ Gedächtniszellen. Überraschenderweise waren dies die beiden Patientinnen, bei denen sich eine aGvHD der Haut entwickelte.

CD69

Sowohl bei den $CD4^+$ als auch bei den $CD8^+$ Gedächtniszellen lässt sich feststellen, dass an den frühen Zeitpunkten nach der Transplantation eine gegenüber der Expression beim gesunden

Spender erhöhte Expression vorhanden war. Dies könnte zum einen auf die stärkere Aktivierung dieser Zellen nach der Transplantation hindeuten, da CD69 als früher Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen gilt [135]. Andere Studien haben gezeigt, dass CD69 auf den CD4⁺ Zellen für die Migration und das Verbleiben der CD4⁺ Zellen im Knochenmark relevant ist [132, 158]. Die nach der Transplantation erhöhte und im Verlauf abnehmende Expression könnte auf die Migration dieser Zellen in das Knochenmark hindeuten. Bei einer Patientin (Nr. 7) konnte bereits an Tag +1 nach Transplantation eine hohe CD69 Expression (21,4% auf den CD4⁺ und 17,8% auf den CD8⁺ Gedächtniszellen) festgestellt werden, die an Tag +7 deutlich absank. Es ist denkbar, dass die Migration der Zellen in das Knochenmark bereits in den ersten Tagen nach der Transplantation stattfindet.

4.2.2.4 α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen nach allo-HSZT

α -Defensine (HNP 1-3, engl. *human neutrophil peptide 1-3*) sind antimikrobielle Peptide, welche in den Granula neutrophiler Granulozyten zu finden und damit Teil der angeborenen Immunabwehr sind. Während HNPs in den frühen Vorstufen der neutrophilen Granulozyten (Promyelozyten) in Granula zu finden sind, finden sich deren Vorläufer (proHNPs) in differenzierteren Stadien der Myelopoese und werden über Exozytose sezerniert. [159]

Emmertsen et al. beschreiben, dass die Plasmakonzentration der proHNPs einen Marker für die myelopoetische Aktivität darstellt [160]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der Plasmakonzentration der proHNPs bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut vorangeht. So zeigte sich die Plasmakonzentration von proHNPs bei Emmertsen et al. wenige Tage nach der Transplantation gering, stieg dann als Zeichen der beginnenden Hämatopoese wenige Tage vor dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut an (Tag +7 bis +20) und fiel dann ab Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation wieder ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigte auch die α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen der in dieser Arbeit untersuchten Empfänger allogener Stammzelltransplantate. Dabei zeigte sich eine geringe Expression an Tag +7, welche dann an Tag +15 ein Maximum erreichte und an Tag +30 bis +110 abfiel. Im Mittel fand sich ein Anstieg der Leukozytenzahl $>1/nl$ bei den hier untersuchten Patienten an Tag +18 nach der Transplantation. Im Unterschied zu Emmertsen et al. wurde in dieser Arbeit nicht die Plasmakonzentration der proHNPs, sondern die intrazelluläre Expression der HNPs in Gedächtnis-T-Zellen untersucht. Dennoch scheinen die Verläufe vergleichbar. Eine mögliche Erklärung könnte die konzentrationsabhängige Aufnahme von HNPs in die Gedächtniszellen sein. Es wäre möglich, dass dies wie oben beschrieben über einen Exosomen-abhängigen Mechanismus

vermittelt wird. Es ist anzumerken, dass in dieser Arbeit lediglich zu ausgewählten Zeitpunkten eine Messung stattgefunden hat. Um den tatsächlichen Verlauf der α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen einschätzen zu können, sollten die Untersuchungen insbesondere zu den früheren Zeitpunkten nach der Transplantation in kürzeren Abständen erfolgen. Von den 6 Patienten, deren α -Defensin-Expression gemessen wurden, erhielten 4 Patienten G-CSF (an unterschiedlichen Tagen im Zeitraum von Tag +3 bis Tag +28 nach Transplantation). Ein Einfluss der G-CSF-Applikation auf die Verläufe der α -Defensin-Expression ist wahrscheinlich, ein konkreter Zusammenhang konnte jedoch in der hier untersuchten Kohorte nicht ermittelt werden. Es sind zudem weitere Studien nötig, um den Einfluss der α -Defensin-Expression der Gedächtnis-T-Zellen des Spenders auf die Expression im Empfänger sowie einen möglichen Einfluss auf die Immunrekonstitution zu ermitteln.

4.3 Zusammenfassung der Diskussion

Die durch G-CSF bedingte deutliche Zunahme der CD4⁺ und der CD8⁺ Gedächtniszellen im peripheren Blut ist vermutlich nicht durch eine erhöhte Proliferation bedingt, sondern durch die verminderte Apoptoseeigung der Gedächtniszellen nach G-CSF sowie Mobilisierung der Zellen u.a. aus dem Knochenmark. Die phänotypischen Eigenschaften der Gedächtnis-T-Zellen änderten sich durch die Behandlung mit G-CSF teils signifikant und scheinen nach der Behandlung mit G-CSF eher denen des Knochenmarks zu ähneln als vor Behandlung mit G-CSF, was die hier aufgestellte Theorie der Mobilisierung von Gedächtniszellen aus dem Knochenmark unterstützt. Zudem weisen die signifikanten Änderungen bezüglich der Expression der *Homing*-Moleküle und Chemokinrezeptoren auf ein verändertes Migrationsverhalten der Gedächtniszellen hin.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse beim Stammzellempfänger die beeinträchtigte Immunrekonstitution, welche sich durch die reduzierte absolute Zellzahl der Gedächtniszellen auch noch an Tag +110 äußert. Neben dieser quantitativen Beeinträchtigung, zeigt sich auch die qualitative Beeinträchtigung, im Sinne der veränderten Zusammensetzung der Populationen, welche vermutlich unter anderem durch die Beeinträchtigung der Thymusfunktion bedingt ist. So ist vor allem die Rekonstitution der CD4⁺ Zellen gestört, welche stärker von der Funktion des Thymus abhängig ist als die der CD8⁺ Zellen [62]. Die deutliche Zunahme der CD8⁺ Zellen und vor allem auch der T_{EM} Zellen liegt in der vermehrten Thymus-unabhängigen homöostatischen Proliferation vor allem der CD8⁺ Zellen und der Effektor-Gedächtniszellen begründet [143]. Möglicherweise führt die Migration der CCR7⁺ T_{CM} und T_{naive} in die lymphatischen Gewebe zu einer prozentualen Abnahme dieser Populationen im Blut.

Die im Verlauf nach Transplantation zunehmende Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin kann auf eine Veränderung des Migrationsverhaltens der Gedächtniszellen im Verlauf hindeuten. Da die Expression von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin darauf hinweist, dass ein Antigenkontakt in den lymphatischen Geweben des Darms stattgefunden hat, kann die Zunahme eine vermehrte Exposition gegenüber Antigenen im Darm darstellen. Auf der anderen Seite steuert $\alpha_4\beta_7$ -Integrin die Migration der Gedächtniszellen in den Darm und die Zunahme kann somit Hinweis auf eine zunehmende Migration der Gedächtniszellen in die lymphatischen Gewebe des Darms sein. Die Abnahme der CD69 Expression kann auf die Migration der CD69⁺ Gedächtniszellen in das Knochenmark hinweisen.

5 Ausblick

Aufgrund der beschränkten Anzahl der Probanden konnten in dieser Arbeit keine signifikanten Zusammenhänge zwischen der Expression der Gewebemarker auf den Gedächtniszellen des Stammzellspenders und dem Verlauf dieser Marker im Empfänger, sowie dem klinischen Verlauf im Empfänger im Sinne von Infektionen und dem Auftreten einer GvHD vorgenommen werden. Weiterführende Untersuchungen sollten dies zum Ziel haben. In dieser Arbeit wurde sich auf die Marker CD69, CLA und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin beschränkt. Es wäre ebenfalls interessant die anderen bei Stammzellspender untersuchten Marker CCR6, CCR10 und CXCR3 auch im Empfänger nachzuvollziehen.

Um genau zu untersuchen, ob gewebespezifische Gedächtniszellen nach der Transplantation im Empfänger in ihre Zielorgane migrieren, wäre es sinnvoll, Probiopsien von Haut oder Magen-Darm-Trakt, welche im Rahmen einer GvHD-Diagnostik entnommen werden, zu untersuchen. Zudem wäre es sinnvoll Proben vom Knochenmark zu untersuchen, um die Migration der Gedächtniszellen ins Knochenmark zu verfolgen. In diesem Zusammenhang ist auch die Analyse von CXCR4 (CD184) als Marker für die Migration ins Knochenmark interessant.

In dieser Arbeit wurden die Veränderungen, welche durch die Mobilisierung mit G-CSF entstehen, untersucht. In der Praxis werden auch andere Medikamenten wie z. B. der CXCR4-Antagonist Plerixafor zur Mobilisierung von Stammzellen eingesetzt. Die unterschiedlichen Regime zu vergleichen, würde es ermöglichen, eventuelle Vor- und Nachteile herauszuarbeiten.

In den letzten Jahren erschienen viele Ansätze im Bereich der Zelltherapie mit dem Ziel die Immunrestitution nach Stammzelltransplantation zu verbessern sowie das Risiko für GvHD und Rezidive zu reduzieren. Dazu gehören unter anderem Therapien mit NK-Zellen, genetisch modifizierte T-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren [161], virusspezifischen T-Zellen [162], mesenchymalen Stammzellen [163] sowie die Donorlymphozyten-Infusion [164], welche im Verlauf nach der Stammzelltransplantation bei Rezidiven oder Chimärismus-Abfall angewendet wird.

Studien weisen darauf hin, dass vor allem die naiven T-Zellen und nicht die Gedächtnis-T-Zellen eine GvHD verursachen [97-100]. Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse besteht die Vermutung, dass die Gedächtnis-T-Zellen mit G-CSF aus dem Knochenmark mobilisiert werden und hinsichtlich ihres Überlebens vorteilhaft gegenüber denen des peripheren Blutes sind. Zudem zeigt die in Kapitel 1.5 dargestellte Literaturrecherche, dass die Gedächtniszellen des Knochenmarks denen des peripheren Blutes auch bezüglich ihrer Zytotoxizität und Antigenpezifität

überlegen sind. Unsere Daten deuten des Weiteren darauf hin, dass es nach der Transplantation zu einer Migration der Gedächtniszellen ins Knochenmark kommt. Ein denkbarer klinischer Ansatz, die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zu nutzen, wäre der selektive Zelltransfer der mobilisierten Antigen-erfahrenen Gedächtnis-T-Zellen im Verlauf nach der Transplantation zur Verbesserung der Immunrekonstitution und Reduktion der infektbedingten Morbidität und Mortalität. Diese Möglichkeit zu untersuchen, sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

Literaturverzeichnis

1. Lutz, E., K.N. Ward, R. Szydlo, and J.M. Goldman, *Cytomegalovirus antibody avidity in allogeneic bone marrow recipients: evidence for primary or secondary humoral responses depending on donor immune status*. J Med Virol, 1996. **49**(1): p. 61-5.
2. Lausen, B.F., L. Hougs, L. Schejbel, C. Heilmann, and T. Barington, *Human memory B cells transferred by allogeneic bone marrow transplantation contribute significantly to the antibody repertoire of the recipient*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3305-18.
3. Vavassori, M., R. Maccario, A. Moretta, P. Comoli, A. Wack, F. Locatelli, A. Lanzavecchia, E. Maserati, P. Dellabona, G. Casorati, and D. Montagna, *Restricted TCR repertoire and long-term persistence of donor-derived antigen-experienced CD4+ T cells in allogeneic bone marrow transplantation recipients*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5739-47.
4. Peggs, K.S., S. Verfurth, A. Pizzey, N. Khan, M. Guiver, P.A. Moss, and S. Mackinnon, *Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines*. Lancet, 2003. **362**(9393): p. 1375-7.
5. Broere, F.A., S. G.; Sitkovsky, M. V. ; van Eden, W., *T cell subsets and T cell-mediated immunity*, in *Principles of Immunopharmacology*, F.P.P. Nijkamp, M.J., Editor. 2011. p. 15-27.
6. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
7. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
8. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, *Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation*. J Exp Med, 1990. **171**(3): p. 801-17.
9. Whitton, J.L. and J. Zhang, *Principles of cytotoxic T lymphocyte induction and recognition*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **202**: p. 247-59.
10. Razvi, E.S., Z. Jiang, B.A. Woda, and R.M. Welsh, *Lymphocyte apoptosis during the silencing of the immune response to acute viral infections in normal, lpr, and Bcl-2-transgenic mice*. Am J Pathol, 1995. **147**(1): p. 79-91.
11. Clark, R.A., *Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 362-70.
12. D'Asaro, M., F. Dieli, N. Caccamo, M. Musso, F. Porretto, and A. Salerno, *Increase of CCR7-CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease*. Leukemia, 2006. **20**(3): p. 545-7.
13. Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo, *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 24-35.
14. Gattinoni, L., E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C.M. Paulos, M.F. Quigley, J.R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D.C. Douek, D.A. Price, C.H. June, F.M. Marincola, M. Roederer, and N.P. Restifo, *A human memory T cell subset with stem cell-like properties*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1290-7.
15. Gattinoni, L., C.A. Klebanoff, and N.P. Restifo, *Paths to stemness: building the ultimate antitumour T cell*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(10): p. 671-84.
16. von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, *T-cell function and migration. Two sides of the same coin*. N Engl J Med, 2000. **343**(14): p. 1020-34.
17. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
18. Gallatin, M., T.P. St John, M. Siegelman, R. Reichert, E.C. Butcher, and I.L. Weissman, *Lymphocyte homing receptors*. Cell, 1986. **44**(5): p. 673-80.
19. Kunkel, E.J. and E.C. Butcher, *Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 1-4.

20. Purwar, R., J. Campbell, G. Murphy, W.G. Richards, R.A. Clark, and T.S. Kupper, *Resident memory T cells (T(RM)) are abundant in human lung: diversity, function, and antigen specificity*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16245.
21. Clark, R.A., B. Chong, N. Mirchandani, N.K. Brinster, K. Yamanaka, R.K. Dowgiert, and T.S. Kupper, *The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4431-9.
22. Agace, W.W., *T-cell recruitment to the intestinal mucosa*. Trends Immunol, 2008. **29**(11): p. 514-22.
23. Masopust, D., V. Vezy, A.L. Marzo, and L. Lefrancois, *Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2413-7.
24. Gebhardt, T., L.M. Wakim, L. Eidsmo, P.C. Reading, W.R. Heath, and F.R. Carbone, *Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus*. Nat Immunol, 2009. **10**(5): p. 524-30.
25. Hofmann, M., A. Oschowitz, S.R. Kurzhals, C.C. Kruger, and H. Pircher, *Thymus-resident memory CD8+ T cells mediate local immunity*. Eur J Immunol, 2013. **43**(9): p. 2295-304.
26. Clark, R.A., B.F. Chong, N. Mirchandani, K. Yamanaka, G.F. Murphy, R.K. Dowgiert, and T.S. Kupper, *A novel method for the isolation of skin resident T cells from normal and diseased human skin*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(5): p. 1059-70.
27. Ganusov, V.V. and R.J. De Boer, *Do most lymphocytes in humans really reside in the gut?* Trends Immunol, 2007. **28**(12): p. 514-8.
28. Mueller, S.N., T. Gebhardt, F.R. Carbone, and W.R. Heath, *Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 137-61.
29. Bevan, M.J., *Memory T cells as an occupying force*. Eur J Immunol, 2011. **41**(5): p. 1192-5.
30. Sathaliyawala, T., M. Kubota, N. Yudanin, D. Turner, P. Camp, J.J. Thome, K.L. Bickham, H. Lerner, M. Goldstein, M. Sykes, T. Kato, and D.L. Farber, *Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets*. Immunity, 2013. **38**(1): p. 187-97.
31. Okhrimenko, A., J.R. Grun, K. Westendorf, Z. Fang, S. Reinke, P. von Roth, G. Wassilew, A.A. Kuhl, R. Kudernatsch, S. Demski, C. Scheibenbogen, K. Tokoyoda, M.A. McGrath, M.J. Raftery, G. Schonrich, A. Serra, H.D. Chang, A. Radbruch, and J. Dong, *Human memory T cells from the bone marrow are resting and maintain long-lasting systemic memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(25): p. 9229-34.
32. Letsch, A., M. Knoedler, I.K. Na, F. Kern, A.M. Asemisen, U. Keilholz, M. Loesch, E. Thiel, H.D. Volk, and C. Scheibenbogen, *CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow*. Eur J Immunol, 2007. **37**(11): p. 3063-8.
33. Palendira, U., R. Chinn, W. Raza, K. Piper, G. Pratt, L. Machado, A. Bell, N. Khan, A.D. Hislop, R. Steyn, A.B. Rickinson, C.D. Buckley, and P. Moss, *Selective accumulation of virus-specific CD8+ T cells with unique homing phenotype within the human bone marrow*. Blood, 2008. **112**(8): p. 3293-302.
34. Guerreiro, M., I.K. Na, A. Letsch, D. Haase, S. Bauer, C. Meisel, A. Roemhild, P. Reinke, H.D. Volk, and C. Scheibenbogen, *Human peripheral blood and bone marrow Epstein-Barr virus-specific T-cell repertoire in latent infection reveals distinct memory T-cell subsets*. Eur J Immunol, 2010. **40**(6): p. 1566-76.
35. Racanelli, V., M.A. Frassanito, P. Leone, C. Brunetti, S. Ruggieri, and F. Dammacco, *Bone marrow of persistently hepatitis C virus-infected individuals accumulates memory CD8+ T cells specific for current and historical viral antigens: a study in patients with benign hematological disorders*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5387-98.
36. Di Rosa, F. and R. Pabst, *The bone marrow: a nest for migratory memory T cells*. Trends Immunol, 2005. **26**(7): p. 360-6.
37. Tokoyoda, K., S. Zehentmeier, A.N. Hegazy, I. Albrecht, J.R. Grun, M. Lohning, and A. Radbruch, *Professional memory CD4+ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 721-30.

38. Parretta, E., G. Cassese, P. Barba, A. Santoni, J. Guardiola, and F. Di Rosa, *CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow*. J Immunol, 2005. **174**(12): p. 7654-64.
39. Becker, T.C., S.M. Coley, E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Bone marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1269-73.
40. Zhang, X., H. Dong, W. Lin, S. Voss, L. Hinkley, M. Westergren, G. Tian, D. Berry, D. Lewellen, R.G. Vile, L. Chen, D.L. Farber, and S.E. Strome, *Human bone marrow: a reservoir for "enhanced effector memory" CD8+ T cells with potent recall function*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6730-7.
41. Slifka, M.K., J.K. Whitmire, and R. Ahmed, *Bone marrow contains virus-specific cytotoxic T lymphocytes*. Blood, 1997. **90**(5): p. 2103-8.
42. Di Rosa, F. and A. Santoni, *Bone marrow CD8 T cells are in a different activation state than those in lymphoid periphery*. Eur J Immunol, 2002. **32**(7): p. 1873-80.
43. Di Rosa, F. and T. Gebhardt, *Bone Marrow T Cells and the Integrated Functions of Recirculating and Tissue-Resident Memory T Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 51.
44. Rank, A.K., H.-J., *Stammzelltransplantation*, in *Facharztwissen Hämatologie Onkologie*, K.R. Possinger, A.C, Editor. 2015, Elsevier GmbH: München. p. 197-216.
45. Copelan, E.A., *Hematopoietic stem-cell transplantation*. N Engl J Med, 2006. **354**(17): p. 1813-26.
46. Bleakley, M. and S.R. Riddell, *Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(5): p. 371-80.
47. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 340-52.
48. Apperley, J.M., T., *Graft-versus-host disease*, in *The EBMT Handbook-Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, J.C. Apperley, E.; Gluckman, E.; Masszi T., Editor. 2012, European School of Haematology: Genf. p. 216-233.
49. Bosch, M., F.M. Khan, and J. Storek, *Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation*. Curr Opin Hematol, 2012. **19**(4): p. 324-35.
50. Mackall, C.L., *T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review*. Stem Cells, 2000. **18**(1): p. 10-8.
51. Toubert, A., *Immune reconstitution after allogeneic HSCT*, in *The EBMT Handbook - Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, E.C. J. Apperley, E. Gluckman, T. Masszi, Editor. 2012, European School of Haematology: Genf. p. 234-247.
52. Rovira, M.M., J.; Carreras, E., *Infections after HSCT*, in *The EBMT Handbook-Haematopoietic Stem Cell Transplantation*, J.C. Apperley, E.; Gluckman, E.; Masszi T., Editor. 2012, European School of Haematology: Genf. p. 196-215.
53. Tomblyn M, C.T., Einsele H et al. , *Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: A global perspective*. Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**: p. 1143–1238.
54. J. Apperley, E.C., E. Gluckman, T. Masszi, *Haematopoietic Stem Cell Transplantation*. The EBMT Handbook. 2012: European School of Haematology.
55. Ljungman, P., C. Cordonnier, H. Einsele, J. Englund, C.M. Machado, J. Storek, T. Small, B. Center for International, R. Marrow Transplant, P. National Marrow Donor, B. European, G. Marrow Transplant, B. American Society of, T. Marrow, B. Canadian, G. Marrow Transplant, A. Infectious Disease Society of, A. Society for Healthcare Epidemiology of, M. Association of Medical, C. Infectious Diseases, C. Centers for Disease, and Prevention, *Vaccination of hematopoietic cell transplant recipients*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(8): p. 521-6.
56. Storek, J., M. Geddes, F. Khan, B. Huard, C. Helg, Y. Chalandon, J. Passweg, and E. Roosnek, *Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans*. Semin Immunopathol, 2008. **30**(4): p. 425-37.
57. Tomblyn, M., T. Chiller, H. Einsele, R. Gress, K. Sepkowitz, J. Storek, J.R. Wingard, J.A. Young, and M.J. Boeckh, *Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Preface*. Bone Marrow Transplant, 2009. **44**(8): p. 453-5.

58. Na, I.K., F. Wittenbecher, M. Dziubianau, A. Herholz, A. Mensen, D. Kunkel, O. Blau, I. Blau, E. Thiel, L. Uharek, C. Scheibenbogen, K. Rieger, and A. Thiel, *Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin) impairs the thymic output of both conventional and regulatory CD4+ T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients*. *Haematologica*, 2013. **98**(1): p. 23-30.
59. Roux, E., F. Dumont-Girard, M. Starobinski, C.A. Siegrist, C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek, *Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity*. *Blood*, 2000. **96**(6): p. 2299-303.
60. Mackall, C.L., T.A. Fleisher, M.R. Brown, I.T. Magrath, A.T. Shad, M.E. Horowitz, L.H. Wexler, M.A. Adde, L.L. McClure, and R.E. Gress, *Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer*. *Blood*, 1994. **84**(7): p. 2221-8.
61. Mackall, C.L., T.A. Fleisher, M.R. Brown, M.P. Andrich, C.C. Chen, I.M. Feuerstein, M.E. Horowitz, I.T. Magrath, A.T. Shad, S.M. Steinberg, and et al., *Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(3): p. 143-9.
62. Mackall, C.L., T.A. Fleisher, M.R. Brown, M.P. Andrich, C.C. Chen, I.M. Feuerstein, I.T. Magrath, L.H. Wexler, D.S. Dimitrov, and R.E. Gress, *Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy*. *Blood*, 1997. **89**(10): p. 3700-7.
63. Hakim, F.T., S.A. Memon, R. Cepeda, E.C. Jones, C.K. Chow, C. Kasten-Sportes, J. Odom, B.A. Vance, B.L. Christensen, C.L. Mackall, and R.E. Gress, *Age-dependent incidence, time course, and consequences of thymic renewal in adults*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(4): p. 930-9.
64. Storek, J., G. Espino, M.A. Dawson, B. Storer, M.E. Flowers, and D.G. Maloney, *Low B-cell and monocyte counts on day 80 are associated with high infection rates between days 100 and 365 after allogeneic marrow transplantation*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3290-3.
65. Mensen, A., Y. Oh, S.C. Becker, P.G. Hemmati, C. Jehn, J. Westermann, M. Szyska, H. Goldner, B. Dorken, C. Scheibenbogen, R. Arnold, and I.K. Na, *Apoptosis Susceptibility Prolongs the Lack of Memory B Cells in Acute Leukemic Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2015. **21**(11): p. 1895-906.
66. Storek, J., *B-cell immunity after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Cytotherapy*, 2002. **4**(5): p. 423-4.
67. Storek, J., D. Wells, M.A. Dawson, B. Storer, and D.G. Maloney, *Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation*. *Blood*, 2001. **98**(2): p. 489-91.
68. Wu, T., J.S. Young, H. Johnston, X. Ni, R. Deng, J. Racine, M. Wang, A. Wang, I. Todorov, J. Wang, and D. Zeng, *Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells*. *J Immunol*, 2013. **191**(1): p. 488-99.
69. Szyska, M. and I.K. Na, *Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 118.
70. Shono, Y., S. Ueha, Y. Wang, J. Abe, M. Kurachi, Y. Matsuno, T. Sugiyama, T. Nagasawa, M. Imamura, and K. Matsushima, *Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation*. *Blood*, 2010. **115**(26): p. 5401-11.
71. Mensen, A., K. Johrens, I. Anagnostopoulos, S. Demski, M. Oey, A. Stroux, P. Hemmati, J. Westermann, O. Blau, F. Wittenbecher, K. Movassaghi, M. Szyska, S. Thomas, B. Dorken, C. Scheibenbogen, R. Arnold, and I.K. Na, *Bone marrow T-cell infiltration during acute GVHD is associated with delayed B-cell recovery and function after HSCT*. *Blood*, 2014. **124**(6): p. 963-72.
72. Panse, J.P., S. Heimfeld, K.A. Guthrie, M.B. Maris, D.G. Maloney, B.B. Baril, M.T. Little, T.R. Chauncey, B.E. Storer, R. Storb, and B.M. Sandmaier, *Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning*. *Br J Haematol*, 2005. **128**(5): p. 659-67.
73. Yakoub-Agha, I., P. Saule, S. Depil, J.B. Micol, C. Grutzmacher, F. Boulanger-Villard, F. Bauters, J.P. Jouet, J.P. Dessaint, and M. Labalette, *A high proportion of donor CD4+ T cells expressing the lymph node-homing chemokine receptor CCR7 increases incidence and severity of acute graft-*

- versus-host disease in patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancy.* *Leukemia*, 2006. **20**(9): p. 1557-65.
74. Scheinberg, P., J.J. Melenhorst, J.M. Brenchley, B.J. Hill, N.F. Hensel, P.K. Chattopadhyay, M. Roederer, L.J. Picker, D.A. Price, A.J. Barrett, and D.C. Douek, *The transfer of adaptive immunity to CMV during hematopoietic stem cell transplantation is dependent on the specificity and phenotype of CMV-specific T cells in the donor.* *Blood*, 2009. **114**(24): p. 5071-80.
 75. Ljungman, P., R. Brand, H. Einsele, F. Frassoni, D. Niederwieser, and C. Cordonnier, *Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis.* *Blood*, 2003. **102**(13): p. 4255-60.
 76. Peggs, K.S., K. Thomson, E. Samuel, G. Dyer, J. Armoogum, R. Chakraverty, K. Pang, S. Mackinnon, and M.W. Lowdell, *Directly selected cytomegalovirus-reactive donor T cells confer rapid and safe systemic reconstitution of virus-specific immunity following stem cell transplantation.* *Clin Infect Dis*, 2011. **52**(1): p. 49-57.
 77. Melenhorst, J.J., A.M. Leen, C.M. Bollard, M.F. Quigley, D.A. Price, C.M. Rooney, M.K. Brenner, A.J. Barrett, and H.E. Heslop, *Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects.* *Blood*, 2010. **116**(22): p. 4700-2.
 78. Levesque, J.P., Y. Takamatsu, S.K. Nilsson, D.N. Haylock, and P.J. Simmons, *Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor.* *Blood*, 2001. **98**(5): p. 1289-97.
 79. Levesque, J.P., J. Hendy, Y. Takamatsu, P.J. Simmons, and L.J. Bendall, *Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide.* *J Clin Invest*, 2003. **111**(2): p. 187-96.
 80. Petit, I., M. Szyper-Kravitz, A. Nagler, M. Lahav, A. Peled, L. Habler, T. Ponomaryov, R.S. Taichman, F. Arenzana-Seisdedos, N. Fujii, J. Sandbank, D. Zipori, and T. Lapidot, *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.* *Nat Immunol*, 2002. **3**(7): p. 687-94.
 81. Bendall, L.J. and K.F. Bradstock, *G-CSF: From granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent.* *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(4): p. 355-67.
 82. Jin, F., Q. Zhai, L. Qiu, H. Meng, D. Zou, Y. Wang, Q. Li, Z. Yu, J. Han, Q. Li, and B. Zhou, *Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.* *Bone Marrow Transplant*, 2008. **42**(9): p. 581-8.
 83. Golan, K., Y. Vagima, A. Ludin, T. Itkin, S. Cohen-Gur, A. Kalinkovich, O. Kollet, C. Kim, A. Schajnovitz, Y. Ovadya, K. Lapid, S. Shvitiel, A.J. Morris, M.Z. Ratajczak, and T. Lapidot, *S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release.* *Blood*, 2012. **119**(11): p. 2478-88.
 84. Ratajczak, M.Z., H. Lee, M. Wysoczynski, W. Wan, W. Marlicz, M.J. Laughlin, M. Kucia, A. Janowska-Wieczorek, and J. Ratajczak, *Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex.* *Leukemia*, 2010. **24**(5): p. 976-85.
 85. Motabi, I.H. and J.F. DiPersio, *Advances in stem cell mobilization.* *Blood Rev*, 2012. **26**(6): p. 267-78.
 86. Greenbaum, A.M. and D.C. Link, *Mechanisms of G-CSF-mediated hematopoietic stem and progenitor mobilization.* *Leukemia*, 2011. **25**(2): p. 211-7.
 87. Begley, C.G., D. Metcalf, and N.A. Nicola, *Binding characteristics and proliferative action of purified granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on normal and leukemic human promyelocytes.* *Exp Hematol*, 1988. **16**(1): p. 71-9.
 88. Shieh, J.H., R.H. Peterson, D.J. Warren, and M.A. Moore, *Modulation of colony-stimulating factor-1 receptors on macrophages by tumor necrosis factor.* *J Immunol*, 1989. **143**(8): p. 2534-9.

89. Franzke, A., W. Piao, J. Lauber, P. Gatzlaff, C. Konecke, W. Hansen, A. Schmitt-Thomsen, B. Hertenstein, J. Buer, and A. Ganser, *G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases*. *Blood*, 2003. **102**(2): p. 734-9.
90. Luttmann, W.e.a., *Der Experimentator*. 4 ed. 2014: Springer Spektrum. 299.
91. Vermes, I., C. Haanen, H. Steffens-Nakken, and C. Reutelingsperger, *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. *J Immunol Methods*, 1995. **184**(1): p. 39-51.
92. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(3): p. 311-22.
93. Speiser, D.E., M. Migliaccio, M.J. Pittet, D. Valmori, D. Lienard, F. Lejeune, P. Reichenbach, P. Guillaume, I. Luscher, J.C. Cerottini, and P. Romero, *Human CD8(+) T cells expressing HLA-DR and CD28 show telomerase activity and are distinct from cytolytic effector T cells*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(2): p. 459-66.
94. Yuan, J.S., A. Reed, F. Chen, and C.N. Stewart, Jr., *Statistical analysis of real-time PCR data*. *BMC Bioinformatics*, 2006. **7**: p. 85.
95. Streitz, M., T. Miloud, M. Kapinsky, M.R. Reed, R. Magari, E.K. Geissler, J.A. Hutchinson, K. Vogt, S. Schlickeiser, A.H. Kverneland, C. Meisel, H.D. Volk, and B. Sawitzki, *Standardization of whole blood immune phenotype monitoring for clinical trials: panels and methods from the ONE study*. *Transplant Res*, 2013. **2**(1): p. 17.
96. Maecker, H.T., J.P. McCoy, Jr., F.H.I. Consortium, M. Amos, J. Elliott, A. Gaigalas, L. Wang, R. Aranda, J. Banchereau, C. Boshoff, J. Braun, Y. Korin, E. Reed, J. Cho, D. Hafler, M. Davis, C.G. Fathman, W. Robinson, T. Denny, K. Weinhold, B. Desai, B. Diamond, P. Gregersen, P. Di Meglio, F.O. Nestle, M. Peakman, F. Villanova, J. Ferbas, E. Field, A. Kantor, T. Kawabata, W. Komocsar, M. Lotze, J. Nepom, H. Ochs, R. O'Lone, D. Phippard, S. Plevy, S. Rich, M. Roederer, D. Rotrosen, and J.H. Yeh, *A model for harmonizing flow cytometry in clinical trials*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(11): p. 975-8.
97. Chen, B.J., D. Deoliveira, X. Cui, N.T. Le, J. Son, J.F. Whitesides, and N.J. Chao, *Inability of memory T cells to induce graft-versus-host disease is a result of an abortive alloresponse*. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 3115-23.
98. Zhang, P., J. Wu, D. Deoliveira, N.J. Chao, and B.J. Chen, *Allospecific CD4(+) effector memory T cells do not induce graft-versus-host disease in mice*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2012. **18**(10): p. 1488-99.
99. Anderson, B.E., J. McNiff, J. Yan, H. Doyle, M. Mamula, M.J. Shlomchik, and W.D. Shlomchik, *Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(1): p. 101-8.
100. Anderson, B.E., A.L. Tang, Y. Wang, M. Froicu, D. Rothstein, J.M. McNiff, D. Jain, A.J. Demetris, D.L. Farber, W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik, *Enhancing alloreactivity does not restore GVHD induction but augments skin graft rejection by CD4(+) effector memory T cells*. *Eur J Immunol*, 2011. **41**(9): p. 2782-92.
101. Chevallier, P., N. Robillard, M. Illiaquer, J. Esbelin, M. Mohty, C. Bodin-Bressollette, T. Guillaume, V. Stocco, F. Auffray, S. Derenne, L. Planche, M.C. Bene, and B.M. Imbert-Marcille, *Characterization of various blood and graft sources: a prospective series*. *Transfusion*, 2013. **53**(9): p. 2020-6.
102. Sun, L.X., H.Y. Ren, Y.J. Shi, L.H. Wang, and Z.X. Qiu, *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor significantly decreases the expression of CXCR3 and CCR6 on T cells and preferentially induces T helper cells to a T helper 17 phenotype in peripheral blood harvests*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009. **15**(7): p. 835-43.
103. Tayebi, H., F. Kuttler, P. Saas, A. Lienard, B. Petracca, V. Lapierre, C. Ferrand, T. Fest, J. Cahn, D. Blaise, M. Kuentz, P. Herve, P. Tiberghien, and E. Robinet, *Effect of granulocyte colony-stimulating factor mobilization on phenotypical and functional properties of immune cells*. *Exp Hematol*, 2001. **29**(4): p. 458-70.

104. Westermann, J. and R. Pabst, *Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body*. Clin Investig, 1992. **70**(7): p. 539-44.
105. Yakoub-Agha, I., P. Saule, S. Depil, C. Grutzmacher, F. Boulanger, L. Magro, J.P. Jouet, J.P. Dessaint, and M. Labalette, *Comparative analysis of naive and memory CD4+ and CD8+ T-cell subsets in bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood stem cell allografts: impact of donor characteristics*. Exp Hematol, 2007. **35**(6): p. 861-71.
106. Roberts, A.W., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* Growth Factors, 2005. **23**(1): p. 33-41.
107. Ukena, S.N., S. Velaga, L. Goudeva, P. Ivanyi, S. Olek, C.S. Falk, A. Ganser, and A. Franzke, *Human regulatory T cells of G-CSF mobilized allogeneic stem cell donors qualify for clinical application*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e51644.
108. Clark, P. and D.E. Normansell, *Phenotype analysis of lymphocyte subsets in normal human bone marrow*. Am J Clin Pathol, 1990. **94**(5): p. 632-6.
109. He, S., Q. Cao, Y. Qiu, J. Mi, J.Z. Zhang, M. Jin, H. Ge, S.G. Emerson, Y. Zhang, and Y. Zhang, *A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by in vivo administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody*. J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7581-92.
110. Farstad, I.N., T.S. Halstensen, D. Kvale, O. Fausa, and P. Brandtzaeg, *Topographic distribution of homing receptors on B and T cells in human gut-associated lymphoid tissue: relation of L-selectin and integrin alpha 4 beta 7 to naive and memory phenotypes*. Am J Pathol, 1997. **150**(1): p. 187-99.
111. Picker, L.J., J.R. Treer, B. Ferguson-Darnell, P.A. Collins, P.R. Bergstresser, and L.W. Terstappen, *Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 1122-36.
112. Van Haastert, P.J. and P.N. Devreotes, *Chemotaxis: signalling the way forward*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(8): p. 626-34.
113. Xia, M., S. Hu, Y. Fu, W. Jin, Q. Yi, Y. Matsui, J. Yang, M.A. McDowell, S. Sarkar, V. Kalia, and N. Xiong, *CCR10 regulates balanced maintenance and function of resident regulatory and effector T cells to promote immune homeostasis in the skin*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **134**(3): p. 634-644 e10.
114. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012. **36**(5): p. 705-16.
115. Varona, R., V. Cadenas, L. Gomez, A.C. Martinez, and G. Marquez, *CCR6 regulates CD4+ T-cell-mediated acute graft-versus-host disease responses*. Blood, 2005. **106**(1): p. 18-26.
116. Duffner, U., B. Lu, G.C. Hildebrandt, T. Teshima, D.L. Williams, P. Reddy, R. Ordemann, S.G. Clouthier, K. Lowler, C. Liu, C. Gerard, K.R. Cooke, and J.L. Ferrara, *Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD*. Exp Hematol, 2003. **31**(10): p. 897-902.
117. Nagata, K., K. Tanaka, K. Ogawa, K. Kemmotsu, T. Imai, O. Yoshie, H. Abe, K. Tada, M. Nakamura, K. Sugamura, and S. Takano, *Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo*. J Immunol, 1999. **162**(3): p. 1278-86.
118. Cosmi, L., F. Annunziato, M.I.G. Galli, R.M.E. Maggi, K. Nagata, and S. Romagnani, *CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2972-9.
119. Sheridan, B.S., Q.M. Pham, Y.T. Lee, L.S. Cauley, L. Puddington, and L. Lefrancois, *Oral infection drives a distinct population of intestinal resident memory CD8(+) T cells with enhanced protective function*. Immunity, 2014. **40**(5): p. 747-57.
120. Casey, K.A., K.A. Fraser, J.M. Schenkel, A. Moran, M.C. Abt, L.K. Beura, P.J. Lucas, D. Artis, E.J. Wherry, K. Hogquist, V. Vezyz, and D. Masopust, *Antigen-independent differentiation and maintenance of effector-like resident memory T cells in tissues*. J Immunol, 2012. **188**(10): p. 4866-75.
121. Lee, Y.T., J.E. Suarez-Ramirez, T. Wu, J.M. Redman, K. Bouchard, G.A. Hadley, and L.S. Cauley, *Environmental and antigen receptor-derived signals support sustained surveillance of the lungs by pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4085-94.

122. Mackay, L.K., A. Rahimpour, J.Z. Ma, N. Collins, A.T. Stock, M.L. Hafon, J. Vega-Ramos, P. Lauzurica, S.N. Mueller, T. Stefanovic, D.C. Tschärke, W.R. Heath, M. Inouye, F.R. Carbone, and T. Gebhardt, *The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin*. Nat Immunol, 2013. **14**(12): p. 1294-301.
123. Le Floc'h, A., A. Jalil, I. Vergnon, B. Le Maux Chansac, V. Lazar, G. Bismuth, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib, *Alpha E beta 7 integrin interaction with E-cadherin promotes antitumor CTL activity by triggering lytic granule polarization and exocytosis*. J Exp Med, 2007. **204**(3): p. 559-70.
124. Wakim, L.M., A. Woodward-Davis, and M.J. Bevan, *Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(42): p. 17872-9.
125. Rott, L.S., M.J. Briskin, and E.C. Butcher, *Expression of alpha4beta7 and E-selectin ligand by circulating memory B cells: implications for targeted trafficking to mucosal and systemic sites*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(6): p. 807-14.
126. Campbell, D.J. and E.C. Butcher, *Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 135-41.
127. Schutyser, E., S. Struyf, and J. Van Damme, *The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(5): p. 409-26.
128. Hildebrandt, G.C., L.A. Corrion, K.M. Olkiewicz, B. Lu, K. Lowler, U.A. Duffner, B.B. Moore, W.A. Kuziel, C. Liu, and K.R. Cooke, *Blockade of CXCR3 receptor:ligand interactions reduces leukocyte recruitment to the lung and the severity of experimental idiopathic pneumonia syndrome*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 2050-9.
129. Di Rosa, F. and A. Santoni, *Memory T-cell competition for bone marrow seeding*. Immunology, 2003. **108**(3): p. 296-304.
130. Mazo, I.B., M. Honczarenko, H. Leung, L.L. Cavanagh, R. Bonasio, W. Weninger, K. Engelke, L. Xia, R.P. McEver, P.A. Koni, L.E. Silberstein, and U.H. von Andrian, *Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells*. Immunity, 2005. **22**(2): p. 259-70.
131. Cinamon, G., V. Shinder, and R. Alon, *Shear forces promote lymphocyte migration across vascular endothelium bearing apical chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(6): p. 515-22.
132. Shinoda, K., K. Tokoyoda, A. Hanazawa, K. Hayashizaki, S. Zehentmeier, H. Hosokawa, C. Iwamura, H. Koseki, D.J. Tumes, A. Radbruch, and T. Nakayama, *Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(19): p. 7409-14.
133. Shiow, L.R., D.B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and M. Matloubian, *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nature, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
134. Maeda, Y., N. Seki, N. Sato, K. Sugahara, and K. Chiba, *Sphingosine 1-phosphate receptor type 1 regulates egress of mature T cells from mouse bone marrow*. Int Immunol, 2010. **22**(6): p. 515-25.
135. Caruso, A., S. Licenziati, M. Corulli, A.D. Canaris, M.A. De Francesco, S. Fiorentini, L. Peroni, F. Fallacara, F. Dima, A. Balsari, and A. Turano, *Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation*. Cytometry, 1997. **27**(1): p. 71-6.
136. Wilson, S.S., M.E. Wiens, and J.G. Smith, *Antiviral mechanisms of human defensins*. J Mol Biol, 2013. **425**(24): p. 4965-80.
137. Maneerat, Y., K. Prasongsukarn, S. Benjathummarak, W. Dechkhajorn, and U. Chaisri, *Increased alpha-defensin expression is associated with risk of coronary heart disease: a feasible predictive inflammatory biomarker of coronary heart disease in hyperlipidemia patients*. Lipids Health Dis, 2016. **15**: p. 117.
138. Pan, L., J. Delmonte, Jr., C.K. Jalonen, and J.L. Ferrara, *Pretreatment of donor mice with granulocyte colony-stimulating factor polarizes donor T lymphocytes toward type-2 cytokine*

- production and reduces severity of experimental graft-versus-host disease.* Blood, 1995. **86**(12): p. 4422-9.
139. Hartung, T., W.D. Docke, F. Gantner, G. Krieger, A. Sauer, P. Stevens, H.D. Volk, and A. Wendel, *Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers.* Blood, 1995. **85**(9): p. 2482-9.
 140. Nawa, Y., T. Teshima, K. Sunami, Y. Hiramatsu, Y. Maeda, T. Yano, K. Shinagawa, F. Ishimaru, E. Omoto, and M. Harada, *G-CSF reduces IFN-gamma and IL-4 production by T cells after allogeneic stimulation by indirectly modulating monocyte function.* Bone Marrow Transplant, 2000. **25**(10): p. 1035-40.
 141. Sloand, E.M., S. Kim, J.P. Maciejewski, F. Van Rhee, A. Chaudhuri, J. Barrett, and N.S. Young, *Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo.* Blood, 2000. **95**(7): p. 2269-74.
 142. Vasconcelos, Z.F., H.R. Diamond, D.G. Tabak, M.A. Barcinski, and A. Bonomo, *Th1/Th2 lymphokine profile of T cells present in the blood of granulocyte-colony stimulating factor-treated stem-cell donors: up or down modulation.* Blood, 2001. **97**(1): p. 333-5.
 143. Wittenbecher, F., K. Rieger, M. Dziubianau, A. Herholz, A. Mensen, I.W. Blau, L. Uharek, B. Dorken, A. Thiel, and I.K. Na, *Rabbit antithymocyte globulin induces rapid expansion of effector memory CD8 T cells without accelerating acute graft versus host disease.* Leuk Res Rep, 2013. **2**(2): p. 82-5.
 144. Puissant-Lubrano, B., A. Huynh, M. Attal, and A. Blancher, *Evolution of peripheral blood T lymphocyte subsets after allogeneic or autologous hematopoietic stem cell transplantation.* Immunobiology, 2014. **219**(8): p. 611-8.
 145. Toubert, A., S. Glauzy, C. Douay, and E. Clave, *Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again.* Tissue Antigens, 2012. **79**(2): p. 83-9.
 146. Clave, E., M. Busson, C. Douay, R. Peffault de Latour, J. Berrou, C. Rabian, M. Carmagnat, V. Rocha, D. Charron, G. Socie, and A. Toubert, *Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.* Blood, 2009. **113**(25): p. 6477-84.
 147. Ogonek, J., M. Kralj Juric, S. Ghimire, P.R. Varanasi, E. Holler, H. Greinix, and E. Weissinger, *Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation.* Front Immunol, 2016. **7**: p. 507.
 148. Roberto, A., L. Castagna, V. Zanon, S. Bramanti, R. Crocchiolo, J.E. McLaren, S. Gandolfi, P. Tentorio, B. Sarina, I. Timofeeva, A. Santoro, C. Carlo-Stella, B. Bruno, C. Carniti, P. Corradini, E. Gostick, K. Ladell, D.A. Price, M. Roederer, D. Mavilio, and E. Lugli, *Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation.* Blood, 2015. **125**(18): p. 2855-64.
 149. Lugli, E., L. Gattinoni, A. Roberto, D. Mavilio, D.A. Price, N.P. Restifo, and M. Roederer, *Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells.* Nat Protoc, 2013. **8**(1): p. 33-42.
 150. Waring, P. and A. Mullbacher, *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology.* Immunol Cell Biol, 1999. **77**(4): p. 312-7.
 151. Paulsen, M. and O. Janssen, *Pro- and anti-apoptotic CD95 signaling in T cells.* Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 7.
 152. Chen, Y.B., H.T. Kim, S. McDonough, R.D. Odze, X. Yao, S. Lazo-Kallanian, T.R. Spitzer, R. Soiffer, J.H. Antin, and J. Ritz, *Up-Regulation of alpha4beta7 integrin on peripheral T cell subsets correlates with the development of acute intestinal graft-versus-host disease following allogeneic stem cell transplantation.* Biol Blood Marrow Transplant, 2009. **15**(9): p. 1066-76.
 153. Chen, Y.B., S. McDonough, H. Chen, J. Kennedy, C. Illiano, E.C. Attar, K.K. Ballen, B.R. Dey, S.L. McAfee, M. Jagasia, R. Soiffer, T.R. Spitzer, and J. Ritz, *Expression of alpha4beta7 integrin on memory CD8(+) T cells at the presentation of acute intestinal GVHD.* Bone Marrow Transplant, 2013. **48**(4): p. 598-603.

154. Avanzini, M.A., R. Maccario, F. Locatelli, S. Giebel, C.D. Santos, M.E. Bernardo, D. Pagliara, D. Montagna, S. Longo, G. Amendola, and M. Marconi, *Low percentages of circulating CD8(+)/CD45RA(+) human T lymphocytes expressing beta7 integrin correlate with the occurrence of intestinal acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(10): p. 1429-34.
155. Engelhardt, B.G., M. Jagasia, B.N. Savani, N.L. Bratcher, J.P. Greer, A. Jiang, A.A. Kassim, P. Lu, F. Schuening, S.M. Yoder, M.T. Rock, and J.E. Crowe, Jr., *Regulatory T cell expression of CLA or alpha(4)beta(7) and skin or gut acute GVHD outcomes*. *Bone Marrow Transplant*, 2011. **46**(3): p. 436-42.
156. Waldman, E., S.X. Lu, V.M. Hubbard, A.A. Kochman, J.M. Eng, T.H. Terwey, S.J. Muriglan, T.D. Kim, G. Heller, G.F. Murphy, C. Liu, O. Alpdogan, and M.R. van den Brink, *Absence of beta7 integrin results in less graft-versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine*. *Blood*, 2006. **107**(4): p. 1703-11.
157. Tsuchiyama, J., T. Yoshino, T. Saito, T. Furukawa, K. Ito, I. Fuse, and Y. Aizawa, *Cutaneous lymphocyte antigen-positive T cells may predict the development of acute GVHD: alterations and differences of CLA+ T- and NK-cell fractions*. *Bone Marrow Transplant*, 2009. **43**(11): p. 863-73.
158. Schoenberger, S.P., *CD69 guides CD4+ T cells to the seat of memory*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(22): p. 8358-9.
159. Faurischou, M., S. Kamp, J.B. Cowland, L. Udby, A.H. Johnsen, J. Calafat, H. Winther, and N. Borregaard, *Prodefensins are matrix proteins of specific granules in human neutrophils*. *J Leukoc Biol*, 2005. **78**(3): p. 785-93.
160. Emmertsen, F., A. Glenthoj, J. Sonderskov, P. Kampmann, H. Sengelov, and N. Borregaard, *ProHNPs are specific markers of normal myelopoiesis*. *Blood Cancer J*, 2014. **4**: p. e193.
161. Tsirigotis, P., A. Shimoni, and A. Nagler, *The expanding horizon of immunotherapy in the treatment of malignant disorders: allogeneic hematopoietic stem cell transplantation and beyond*. *Ann Med*, 2014. **46**(6): p. 384-96.
162. O'Reilly, R.J., E. Doubrovina, D. Trivedi, A. Hasan, W. Kollen, and G. Koehne, *Adoptive transfer of antigen-specific T-cells of donor type for immunotherapy of viral infections following allogeneic hematopoietic cell transplants*. *Immunol Res*, 2007. **38**(1-3): p. 237-50.
163. Kim, E.J., N. Kim, and S.G. Cho, *The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation*. *Exp Mol Med*, 2013. **45**: p. e2.
164. Roush, K.S. and C.D. Hillyer, *Donor lymphocyte infusion therapy*. *Transfus Med Rev*, 2002. **16**(2): p. 161-76.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lisa Isabel Olfe, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von Gedächtnis-T-Zellen im Kontext der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung Publikationen

Lisa Isabel Olfe hatte folgenden Anteil an folgender Publikationen:

1. Becker, S.C., Szyska, M., Mensen, A., Hellwig, K., Otto, R., **Olfe, L.**, Vuong, L., Tietze-Bürger, C., Volk, H.D., Dörner, T., Dörken, B., Scheibenbogen, C., Uharek, L., Arnold, R., Schröder, J., Hocke, A.C. and Na, I.-K., *Bone marrow-resident memory cells are equipped with α -defensin*. Eingereicht bei Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017.

Das Paper befindet sich derzeit in der Revision.

Beitrag im Einzelnen: Lisa Isabel Olfe führte die Experimente und Analysen zur Expression von α -Defensin in Gedächtniszellen des peripheren Blutes vor und nach Behandlung von Stammzellspendern mit G-CSF durch.

2. **Olfe, L.**, Asadi K., Becker S., Mensen A., Szyska M., Tietze-Bürger C., Scheibenbogen C., Schetelig J., Dörken B., Arnold R. and Na I.-K., *Mobilization of tissue-resident memory cells by the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)*. Jahrestagung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie), 2016 (Posterpräsentation).

Beitrag im Einzelnen: Lisa Isabel Olfe konzipierte die Experimente, führte die Experimente und Analysen durch und interpretierte die Ergebnisse.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Paper:

Becker, S.C., Szyska, M., Mensen, A., Hellwig, K., Otto, R., **Olfe, L.**, Vuong, L., Tietze-Bürger, C., Volk, H.D., Dörner, T., Dörken, B., Scheibenbogen, C., Uharek, L., Arnold, R., Schröder, J., Hocke, A.C. and Na, I.-K., *Bone marrow-resident memory cells are equipped with α -defensin*. Eingereicht bei Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2017.

Poster:

Olfe, L., Asadi K., Becker S., Mensen A., Szyska M., Tietze-Bürger C., Scheibenbogen C., Schetelig J., Dörken B., Arnold R. and Na I.-K., *Mobilization of tissue-resident memory cells by the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)*. Jahrestagung der DGHO (Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie), 2016.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich PD Dr. Il-Kang Na für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Die enge persönliche Zusammenarbeit, ihre hilfreichen Anregungen und ihr kompetenter Rat bei der Erstellung dieser Arbeit haben mich stets sehr motiviert. Auch die Unterstützung in organisatorischen und praktischen Fragen, wie die Vermittlung der zu untersuchenden Proben über die Stem Cell Facility und die Transplantationsstation der Charité, weiß ich sehr zu schätzen.

Für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden und die Hilfestellungen in allen Bereichen meiner Arbeit möchte ich Dr. Martin Szyska, Dr. Angela Mensen und ganz besonders auch Sonya Becker sehr herzlich danken. Ich habe von Ihnen eine großartige Unterstützung erfahren, die meine Arbeit erst möglich machte. Auch den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Na und Scheibenbogen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft in praktischen Fragen und das stets sehr nette Arbeitsklima danken. Mein Dank gilt zudem den Mitarbeitern der Stem Cell Facility sowie Dr. Lam Voung, die mich in organisatorischen Belangen sehr unterstützt haben.

Allen beteiligten Patienten und Spendern möchte ich für die Teilnahme an meiner Arbeit danken, denn sie haben die wichtigste Grundlage für dieses Forschungsanliegen geschaffen.

Danken möchte ich zudem der Berliner Krebsgesellschaft für die Unterstützung in Form eines Stipendiums. Diese finanzielle Hilfe machte es mir möglich mich voll und ganz der Forschung zu widmen.

Großer Dank gilt auch meiner Familie, meinem Freund und meinen Freuden, die mir während meiner Arbeit eine große Stütze waren.